

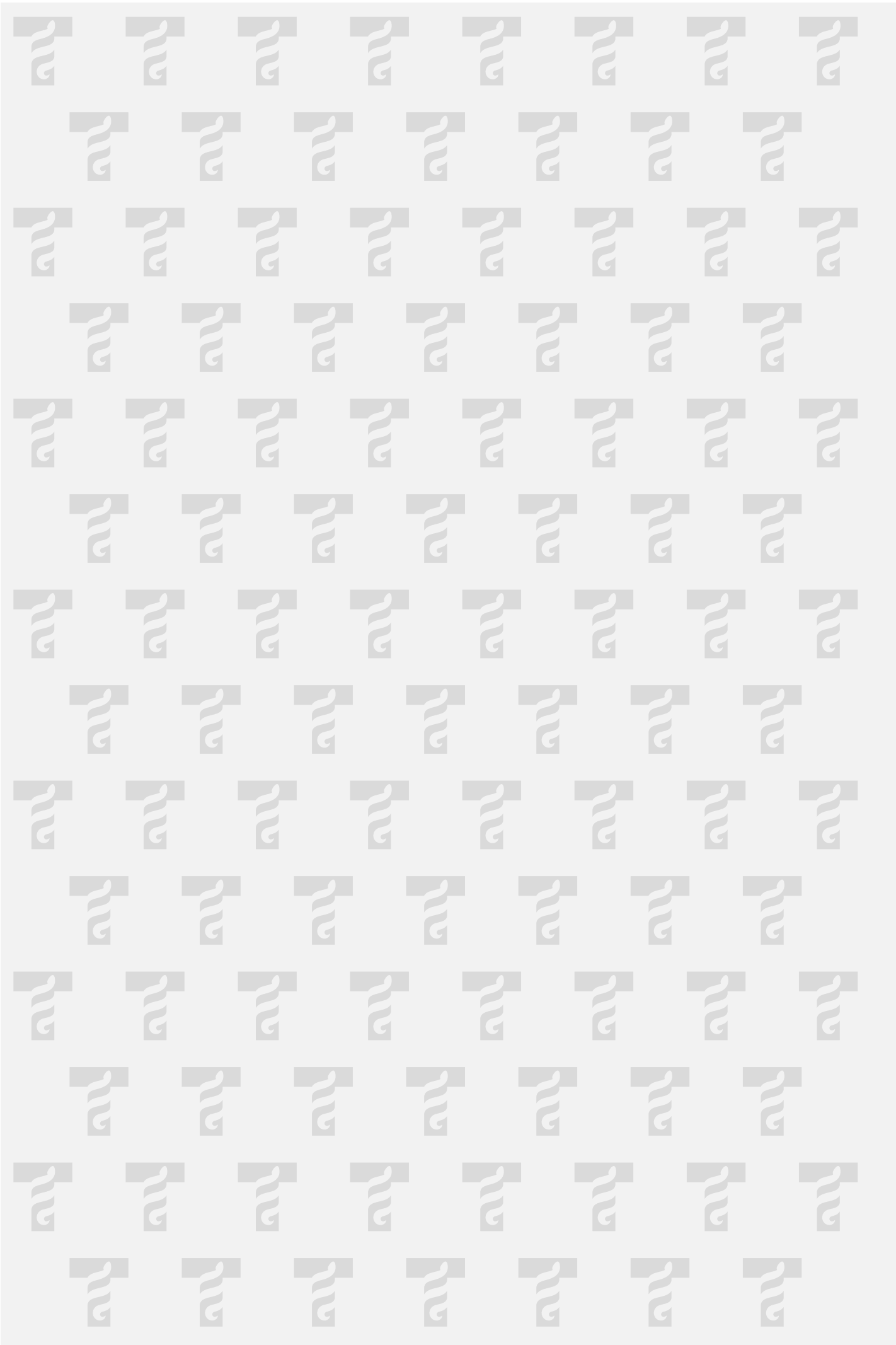


BIOTOX

Toxinas para la Biomedicina
Red CYTED.212RT0467



TEMAS SELECCIONADOS DE TOXINAS CON IMPLICACIONES BIOMÉDICAS Y MÉTODOS PARA SU ESTUDIO



TEMAS SELECCIONADOS DE TOXINAS
CON IMPLICACIONES BIOMÉDICAS
Y MÉTODOS PARA SU ESTUDIO

ÍNDICE

IDENTIFICACIÓN DE TOXINAS CON
ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA EN EL
VENENO DEL ESCORPIÓN
Tityus discrepans

10

26

METALOPROTEINASAS DEPENDIENTES
DE ZINC: PROTAGONISTAS CENTRALES
EN LA FISIOPATOLOGÍA DE
ENVENENAMIENTOS POR SERPIENTES
DE LA FAMILIA VIPERIDAE

PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS
DE *Stichodactyla helianthus* Y SUS
APLICACIONES EN LA BIOMEDICINA

37

59

DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO EN EL
INSTITUTO CLODOMIRO PICADO

UTILIDAD DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS
EN ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN
E IDENTIFICACIÓN DE EPITOPOS
EN TOXINAS

71

82

MONOCAPAS Y BICAPAS LIPÍDICAS
EN EL ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE
BIOCOMPUESTOS ACTIVOS CONTRA
BIOMEMBRANAS. MODULACION
SUPRAMOLECULAR DE LA ACTIVIDAD
LIPOLÍTICA EN SUPERFICIES LIPÍDICAS.

INTERACTIONS OF STICHOLYSIN I WITH
DPPC/SM BILAYERS. A MOLECULAR
DYNAMICS STUDY

96

115

CALTX A NEW TOXIN (13 AMINO ACID
RESIDUES) BLOCKER OF CALCIUM
CHANNELS OBTAINED FROM
Conus Californicus

LA THALASSIOLINA-B, UN FLAVONOIDE
DE ORIGEN MARINO CON EFECTO
ANTINOCICEPTIVO, BLOQUEA LA
CORRIENTE ASIC EN LAS NEURONAS
DE LOS GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL
DE LA RATA

125

141

LABORATORIO DE VENÓMICA
Y PROTEINÓMICA ESTRUCTURAL

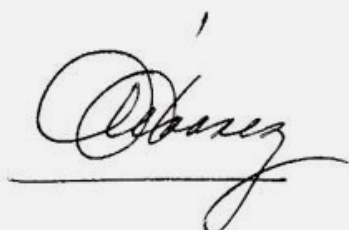
Los capítulos que incluye el libro electrónico Temas seleccionados de toxinas con implicaciones biomédicas y métodos para su estudio resultan de una primera aproximación para mostrar de manera panorámica el trabajo de investigación que desarrollan los miembros de la Red Iberoamericana Temática CYTED 212RTo467 (Biotox) en el campo de las toxinas con implicaciones para la Biomedicina.

El texto no pretende ser exhaustivo, más bien se trata de un material introductorio, de carácter general, cuyo propósito comunicativo es servir como presentación de las líneas de investigación de los principales grupos de Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, España, México y Venezuela pertenecientes a la Red Biotox que se ocupan de toxinas o cuentan con un arsenal metodológico para su caracterización físico-química, biológica o su acción farmacológica.

Los autores son reconocidos especialistas en sus respectivas áreas de trabajo a los cuales agradezco el esfuerzo en la elaboración de este material que puede ser útil a profesionales y estudiantes interesados en conocer aspectos del estado del arte en investigaciones sobre toxinas o métodos para su estudio, en el ámbito iberoamericano. En principio, estos textos fueron concebidos para apoyar las exposiciones que se realizaron en el I Taller-Científico Técnico de Biotox celebrado en el Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica (6-10 agosto, 2012), que dio inicio a las actividades de la Red. Invito a los interesados a acompañar la lectura de los artículos con las correspondientes presentaciones de sus autores. Las presentaciones pueden encontrarse en la Multimedia: Memorias de las actividades de la Red CYTED 212RTo467, Biotox: Toxinas de Interés para la Biomedicina, 2012 (Costa Rica) y posteriormente serán depositadas en la página Web de la Red que se encuentra en desarrollo

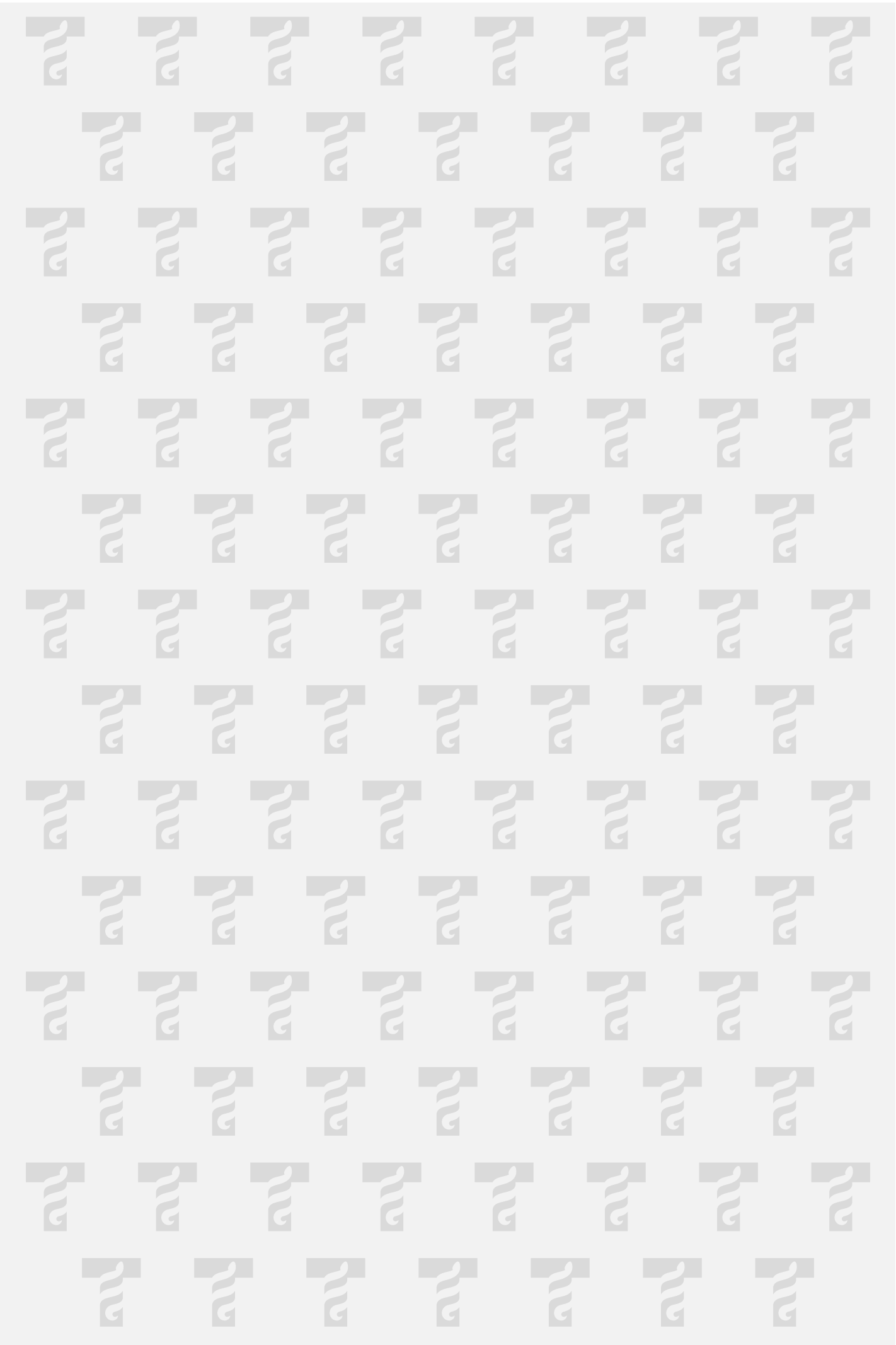
www.iq.usp.br/biotox.

Esperemos el material sea de utilidad a estudiantes, profesionales y otros actores sociales interesados en el tema de toxinas, en especial la comunidad toxinológica iberoamericana.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Álvarez', with a horizontal line underneath.

Carlos M. Álvarez Valcárcel
Coordinador Iberoamericano
Red CYTED 212RTo467 Biotox
Toxinas de Interés para la Biomedicina”
Enero, 2013





IDENTIFICACIÓN DE TOXINAS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA EN EL VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus discrepans*

Gina D'Suze^{*a}, Arnaldo Rosalesa, Víctor Salazar^B, Carlos Sevcik^a

^aLaboratorio de Neurofarmacología Celular,

^BServicio de Histología, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) Caracas, Venezuela.

e-mail: gdsuze@ivic.gob.ve

RESUMEN

En el veneno del escorpión venezolano *Tityus discrepans* se encontraron 4 toxinas con actividad antineoplásica. Estas son integrantes de la fracción I (FI) del veneno separado mediante exclusión molecular, la cual contiene los componentes de mayor peso molecular y es no toxica para los mamíferos. Las 4 toxinas aisladas de la FI mediante cromatografía líquida de alta resolución son péptidos que inducen apoptosis preferencialmente en la línea celular de cáncer de mama humano SKBR3 y tienen poco o ningún efecto sobre las células normales de riñón de mono MA104. Apoptosis es el mecanismo de acción en el cual se basa la eficiencia de drogas antineoplásicas comúnmente utilizadas en quimioterapia. La apoptosis inducida en SKBR3 es equivalente e incluso mayor a los efectos de paclitaxel y vinblastina estudiados en condiciones similares. Mediante inmunohistoquímica se determinó que las toxinas se unen a la membrana plasmática y que la muerte ocurre por inducción de apoptosis mediante la sobreexpresión de FasL (D'Suze et al., 2010). Este es el punto de inicio de una serie de eventos bioquímicos nucleares codificados genéticamente relacionados con la activación de las caspasas citoplasmáticas.

PALABRAS CLAVES: Veneno de Escorpión, SKBR3, Compuestos Anticancerígenos, Apoptosis, FasL.

ABSTRACT

Four toxins with antineoplastic activity were isolated from the Venezuelan *Tityus discrepans* scorpion venom. These toxins are part of fraction I (FI) from the molecular exclusion isolation, which contains the higher molecular weight components and is also non-toxic to mammals. The active toxins, isolated from FI by HPLC, are peptides able to induce apoptosis preferentially in human breast cancer cell line SKBR3. The same toxins, have little or no effect on normal monkey kidney cell line MA104. Apoptosis is the action mechanism underlying the efficiency of commonly used antineoplastic drugs in chemotherapy. Induced apoptosis in SKBR3 is completely equivalent or even greater than the effects of paclitaxel and vinblastine studied under similar conditions. It was determined by immunohistochemistry that these toxins bind to the plasma membrane inducing cell death by apoptosis as consequence of FasL overexpression (D'Suze et al., 2010). This is the starting point of a series of nuclear biochemical events genetically encoded, related with cytoplasmic activation of caspases.

KEY WORDS: Scorpion venom, SKBR3, FasL, Antineoplastic natural compounds, Apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Los escorpiones o alacranes son arácnidos de hábitos preferentemente nocturnos. Han vivido en la tierra desde hace mas de 400 millones de años; se encuentran entre los primeros artrópodos que tuvieron éxito en el paso del medio acuático al terrestre. Su larga historia evolutiva y la naturaleza proteica de su veneno les han permitido diversificar sus venenos bajo la presión selectiva del medio donde viven. Se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, en donde se estima que existen cerca de 1500 especies, pertenecientes a 12 familias, de las cuales la familia Buthidae es la única que contiene las especies con veneno peligroso para los humanos. En el Continente Americano esta familia tiene dos géneros que son importantes desde el punto de vista de la salud humana, *Tityus* distribuido en América del

Sur, América Central e islas del Caribe y Centruroides en América del Norte, América Central, islas del Caribe y algunas regiones del norte de América del Sur (González-Sponga, 2011).

Los escorpiones del género *Tityus* inducen en el humano una sintomatología compleja denominada “síndrome de emponzoñamiento escorpiónico” (D’Suze y col., 2011) el cual incluye trastornos neurológicos, pancreatitis aguda (Porras, 1994, Ghersy de Nieto y col., 2004), manifestaciones cardiovasculares, edema agudo del pulmón (Mazzei de Dávila y col., 2002), síndrome de dificultad respiratoria por escorpionismo (D’Suze y col., 1999), trastornos de la coagulación (De Sousa y col., 1995; D’Suze y col., 2003; Brazón y col. 2008) y activación de los procesos inflamatorios (Guinand y col., 2004; D’Suze y col., 2004a; 2007). El escorpionismo en Venezuela se caracteriza por inducir una respuesta sistémica con variedad de complicaciones, las cuales dependen de la especie de escorpión, de la cantidad de veneno inoculado y de la sensibilidad del afectado. Estos venenos contienen tanto las toxinas responsables del síndrome de envenenamiento escorpiónico como otras inocuas al ser humano. Las toxinas venenosas al ser humano han sido las mas estudiadas, son las mas abundantes en cuanto a su concentración en el veneno, sin embargo las inocuas al ser humano, casi no han sido estudiadas a pesar de que representan la mayor variedad en el veneno.

El veneno de los escorpiones está constituido por péptidos, enzimas, nucleótidos, lípidos, aminos y otros compuestos no identificados. El estudio proteómico del veneno de *T. discrepans* reveló 205 componentes los cuales se aislaron en columnas de fase reversa dadas sus diferencias en hidrofobicidad y pesos moleculares (Batista y col., 2006). Este trabajo reveló que las toxinas que eluyen entre los primeros 10 minutos tienen masas entre 200 y 2000 Da, en este grupo se han descrito toxinas con actividad inhibitoria de la actividad amidolítica del factor Xa y de la plasmina (Brazón, 2006). Las toxinas que eluyen entre 10 y 20 minutos tienen masas entre 2 y 4 kDa, las eluidas entre 20 a 30 minutos pesan entre 3 kDa y 5 kDa, en estos dos grupos se han

descrito toxinas con actividad en canales de K⁺ (D'Suze y col., 1999; 2004b). El grupo de toxinas que eluyen entre 30 y 40 minutos presentan masas que van entre 5 kDa y 8 kDa estas en su mayoría presentan actividad sobre isocanales de Na⁺ tanto de mamíferos como de invertebrados (D'Suze y col., 1995; 1996; 1997; 2004c). En este tiempo eluyen también las toxinas de cadena larga activas en canales de K⁺ (Diego-García y col., 2007; D'Suze y col., 2009). Los péptidos que eluyen después de los 40 minutos son proteínas mas hidrofóbicas y de mayor peso molecular >8 kDa en donde se pueden encontrar aquellas con actividad curarizante (D'Suze y col., 1995), con actividad enzimática como metaloproteasas, hialuronidasas entre otras (Brazón 2006), activadoras de plaquetas (Brazón y col., 2011) y con actividad antineoplásica (D'Suze y col., 2010).

El interés por el valor farmacéutico de los venenos de escorpión como potenciales agentes terapéuticos contra tumores cancerígenos comenzó con el descubrimiento de la clorotoxina (ChTx). ChTx fue aislada del veneno de *Leiurus quinquestriatus* demostrando tener una potente y selectiva actividad sobre gliomas humanos (DeBin y col., 1993; Soroceanu et al., 1998; Deshane y col., 2003). La ChTx bloquea canales de Cl⁻, pero su efecto anticancerígeno ocurre por inducción de apoptosis. Hasta la fecha unas pocas toxinas con actividad anticancerígena han sido caracterizadas. Algunas ejercen su acción mediante el bloqueo de ciertos canales iónicos (Jäger et al., 2004), otras inhibiendo la invasión y extravasación de las células cancerígenas (Deshane et al., 2003) o activando las vías metabólicas que inducen apoptosis (Gupta et al., 2010). La apoptosis es un tipo de muerte celular iniciada por eventos bioquímicos nucleares codificados genéticamente, relacionados con la activación de las caspasas citoplasmáticas (Green y Reed, 1998). En este trabajo nuestra atención va dirigida hacia los componentes del veneno de *T. discrepans* con actividad anticancerígena. Se estudió la acción del veneno completo y sus componentes purificados mediante HPLC sobre la línea celular SKBR3 de cáncer de mama humano y sobre la línea de células no malignas MA104 de riñón de mono.

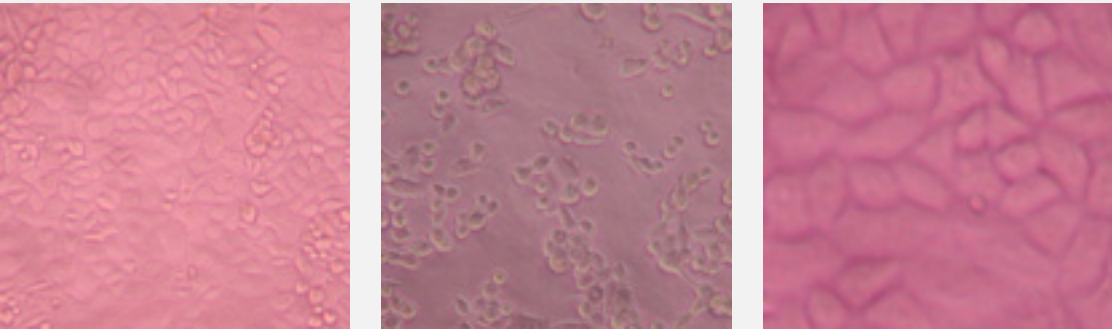
MATERIALES Y MÉTODOS

El veneno fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular convencional empleando una columna de sephadex G-50 (200 x 1 cm, 19 mL/h/cm²) (Pharmacia Biotech AB, St. Louis, MO, U.S.A) equilibrada y eluída a ~25°C con acetato de amonio 20 mM, pH 4,7. La detección de las fracciones se realizó por absorbancia a 280 nm. Se cargó en la columna 100 mg de veneno diluido en 1 mL del tampón de equilibrio (D'Suze y col, 1995). Las fracciones eluídas se liofilizaron y se usaron para ensayos de toxicidad. La fracción mas potente se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) a 25°C, por una columna semipreparativa de fase reversa C₄ (250 x 10 mm) (Vydac, Hesperia, CA, U.S.A). Los componentes se separaron usando un gradiente lineal de solvente A [agua con 0,12 % de ácido trifluoroacético (TFA)] a 80% de Solvente B (acetonitrilo con 0,1 % de TFA), en 80 minutos (1 mL/min, 230 nm). Las fracciones con actividad se recromatografiaron hasta obtener el compuesto puro en una C₄ analítica (250 x 4.6 mm). Se recolectaron manualmente y liofilizaron para el análisis de espectrometría de masa por MALDI-TOF, la degradación automática de Edman y para los experimentos sobre las líneas celulares de cáncer de mama humano SKBR3 (ATCCNumber: HTB-30TM) y células normales de riñón de mono MA104 (ATCCNumber: CRL-2378.1TM). Las líneas celulares se cultivaron a confluencia en placas de 96 pozos en medio DMEM con suero fetal bovino (FBS). Antes de exponerlas al veneno o toxinas puras el medio de cultivo se cambió a DMEN libre de FBS. Ambas líneas celulares fueron incubadas con las fracciones eluídas de Sephadex G-50 fracciones (0,15 µg/µL), se determinó viabilidad celular después de 48 h utilizando bromuro de tiazolil tetrazolio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Mosmann,1983). La muerte celular se determinó mediante la lectura de absorbancia a 570 nm. Para la cuantificación de apoptosis y necrosis las líneas celulares se cultivaron a confluencia en cubreobjetos 22x22 mm² en presencia de medio DMEM con suero fetal bovino (FBS) y se expusieron a las toxinas purificadas (1 µg/µL) durante 5 h. La detección y

cuantificación de las células en apoptosis y necrosis se realizó por microscopia de epifluorescencia utilizando bromuro de etidio (100 µg/mL) y naranja de acridina (100 µg/mL) (EB/AO) en PBS (McGahon et al., 1995; Jolly et al., 1997). Para mayores detalles vea D'Suze et al., 2010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El veneno completo indujo la pérdida de la forma y adhesión de las células al sustrato, contracción y aparición de espi-
gas alargadas en la superficie de algunas de ellas, lisis even-
tual y muerte celular (Fig.1).



A: SKBR3 control

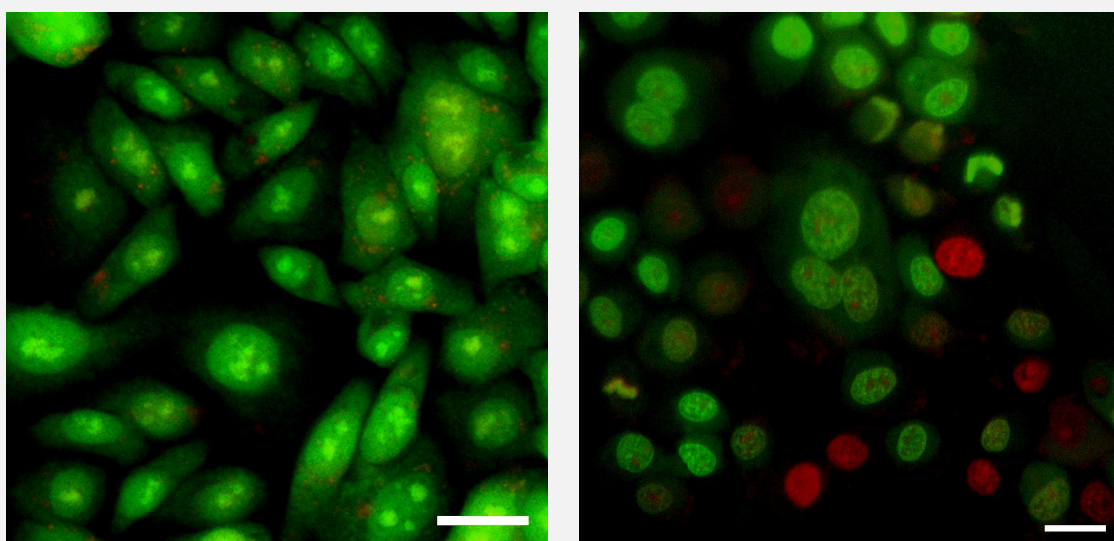
B: SKBR3 FI

C: MA104 FI

Figura 1: *4 x 10⁴ células por pozo cultivadas hasta confluencia en DMEM/10% FBS, penicilina (100 U/mL), gentamicina (48 mg/mL) y anfotericina B (3 mg/mL) en 5% de CO₂ y 37 °C. Antes de exponerlas al veneno se cambiaron a medio libre de FBS. Las fracciones del veneno se resuspendieron en medio DMEN libre de FBS [0,15 µg/µL], las células se mantuvieron a 5% de CO₂ y 37 °C durante 48 h.*

Estos eventos no se producen en las células normales de riñón de mono (MA104) al exponerlas al veneno bajo las mismas condiciones, estas se mantienen formando una monocapa y no cambian su morfología. El efecto inducido por FI sobre las células cancerígenas SKBR3 es dependiente del tiempo de exposicion y de la concentración de veneno (para detalles ver D'Suze et al., 2010). La fracción del veneno de T. discrepans que indujo mayor muerte en la línea celular SKBR3 fue la fracción I proveniente de Sephadex G-50, la cual no es toxica a mamíferos y contiene las toxinas de mayor peso molecular. FI (0.15 µg/µL) indujo 70% de muerte en las

células cancerígenas SKBR3 a las 48 h de exposición. Mediante epifluorescencia se determinó la forma como esta fracción estaba induciendo la muerte celular. Sobre la base de la absorción diferencial de bromuro de etidio y naranja de acridina (EB/AO) se determinó simultáneamente el porcentaje de muerte por necrosis y por apoptosis al exponer las células a la FI ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 5h. Las células vivas se observaron con su núcleo de color verde. Las células apoptóticas tempranas se observaron con un núcleo de color verde brillante, con cromatina condensada o fragmentada. Las células apoptóticas tardías tenían la cromatina condensada y fragmentada de color naranja y las células que murieron a causa de necrosis directa presentaban el núcleo de color naranja estructuralmente normal (Fig. 2).



A: SKBR3 control

B: SKBR3 con veneno ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 5 h

Figura 2: 4×10^4 células se cultivaron a confluencia en cubreobjetos con DMEM-10%FBS. La apoptosis y necrosis se determinó por microscopia de epifluorescencia utilizando bromuro de etidio ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) y naranja de acridina ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) (EB/AO) en PBS. Las células se expusieron a la FI [$0.15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$] por 5 h.

Se fraccionó FI mediante cromatografía líquida de alta resolución hasta lograr la pureza de sus componentes (Fig. 3).

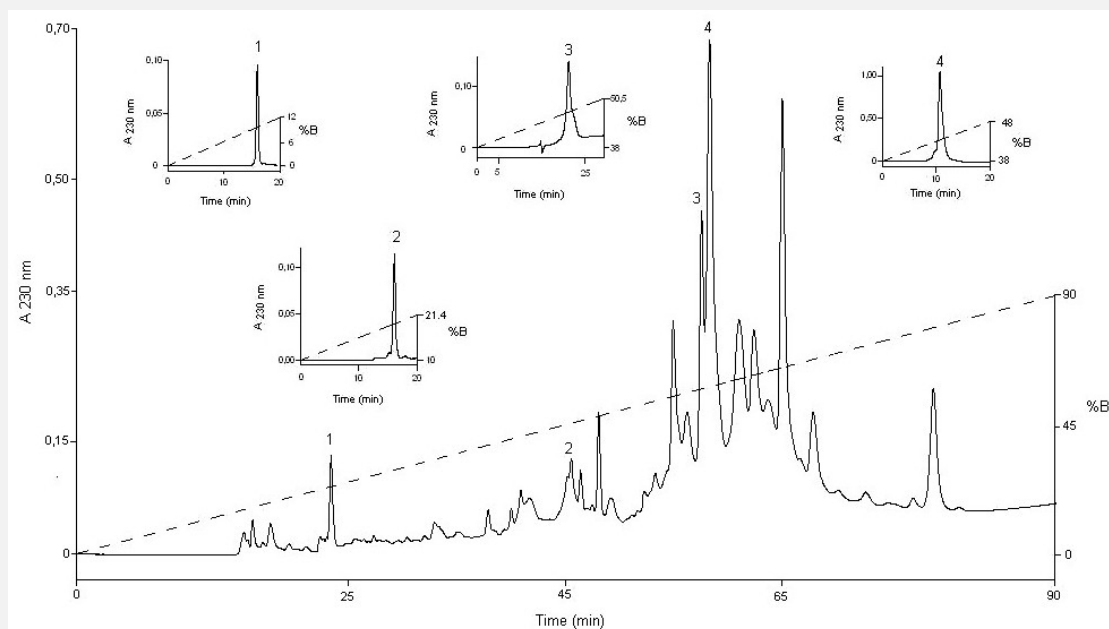
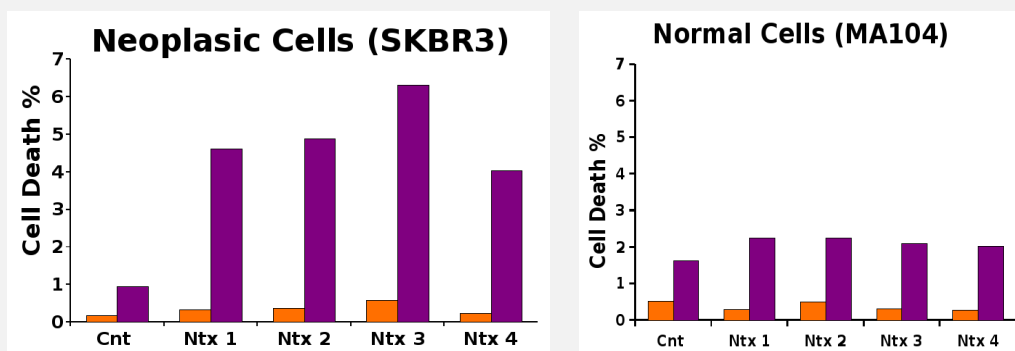


Figura 3: Perfil cromatográfico de FI eluido en una columna semi-preparativa de fase reversa C4 a 1 mL/min usando un gradiente lineal de solución A [agua con 0.12% ácido trifluoroacético (TFA)] hasta 80% solución B (acetonitrilo con 0.10% TFA) en 80 min. Insertos: Purificación de los componentes activos presentes en la FI eluidos en una C4 analítica. Los picos identificados como 1, 2, 3 y 4 son toxinas con actividad antineoplásica; de los cuales 3 y 4 son neopladina 1 y neopladina 2 (D'Suze et al., 2010).

Se estudió el efecto de todos los componentes de la FI cada uno por separado sobre las líneas celulares SKBR3 y MA104. Para ello se calcularon los porcentajes de necrosis y apoptosis de las líneas celulares cultivadas a confluencia en cubreobjetos 22x22 mm² en presencia de medio DMEM-FBS. Cada uno de los componentes de la FI se disolvió por separado a una concentración de 1 µg/µL en medio DMEN libre de FBS y se expusieron las células a ellos durante 5 h. Luego se trataron las células con bromuro de etidio y naranja de acridina en PBS y se observaron con epifluorescencia. Al grupo de las células controles se les agregó medio DMEN libre de FBS. Se usaron como controles positivos paclitaxel 6 nM (Clitaxel Nolver CA, Venezuela) y vinblastina 6 nM (VinblastinaTN, Elmor SA, Venezuela). Los porcentajes de apoptosis y necrosis se determinaron en base de al menos 1500 células contadas desde campos seleccionados al azar. Los datos representan al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado (Fig.

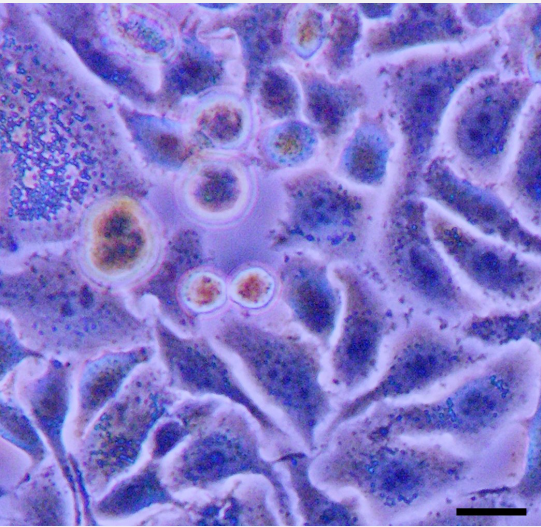


4). **Figura4:** Porcentaje de muerte celular por apoptosis o necrosis inducido por las toxinas purificadas de la F1. 4×10^4 células se cultivaron a confluencia en cubreobjetos $22 \times 22 \text{ mm}^2$ con medio DMEM-FBS. Las células se expusieron a las toxinas puras (NTx) $[1 \mu\text{g}/\mu\text{L}]$ durante 5 h. Barras moradas: % apoptosis. Barras anaranjadas: % necrosis.

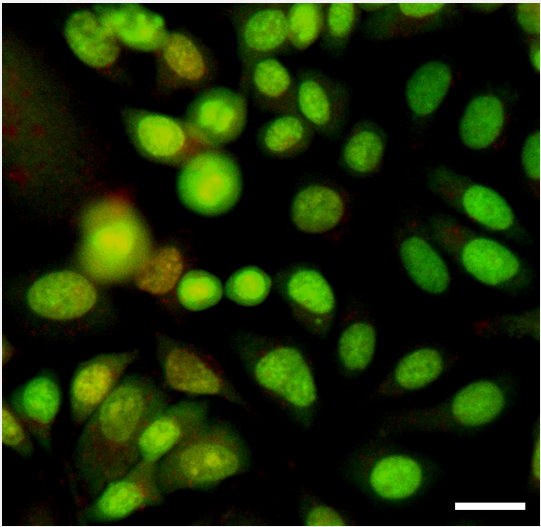
La FI contiene 4 péptidos que inducen apoptosis con selectividad para las células de cáncer de mama humano SKBR3, su efecto en células no malignas renales de mono MA104 no fué estadísticamente diferente a los controles. En los controles positivos con paclitaxel se observó en las células SKBR3 ($n = 1714$): $3,2 \pm 0,43\%$ de apoptosis y $0,47 \pm 0,17\%$ de necrosis, pero en la línea celular MA104 ($n = 952$) paclitaxel solo indujo $0,42 \pm 0,21\%$ de apoptosis y no necrosis. La vinblastina induce $4,69 \pm 0,50\%$ de apoptosis y $1,87 \pm 0,32\%$ de necrosis en la línea celular SKBR3 ($n = 1814$), el mismo fármaco indujo $3,2 \pm 0,56\%$ apoptosis y $0,2 \pm 0,14\%$ de necrosis en las células MA104 ($n = 999$) (D'Suze et al., 2010). Los porcentajes de apoptosis inducidos por las toxinas de la FI sobre las células SKBR3 fueron mayores que los inducidos por los controles positivos. Estas toxinas a tiempos cortos y/o en concentraciones bajas, inducen un efecto apoptótico significativo sin necrosis.

En la Figura 5 se muestran micrografías de contraste de fase y de fluorescencia en las que las exposiciones (5h) a las toxinas purificadas NTx de la FI ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) inducen fragmentación nuclear, condensación del citoplasma, las células formaron picos en la membrana plasmática, vesículas intracelulares y pérdida de confluencia celular en las células de cancer de mama SKBR3 pero no en las células renales de mono MA104. Los efectos apoptóticos observados se ase-

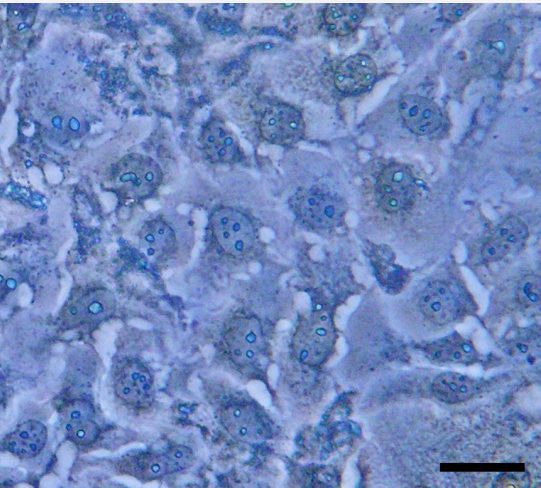
mejan a los causados por el veneno de *B. martensii* (Karsch) en glioma humano y al efecto inducido por el veneno de *H. bengalensis* en células leucémicas (Wang y Ji, 2005; Gupta et al, 2010).



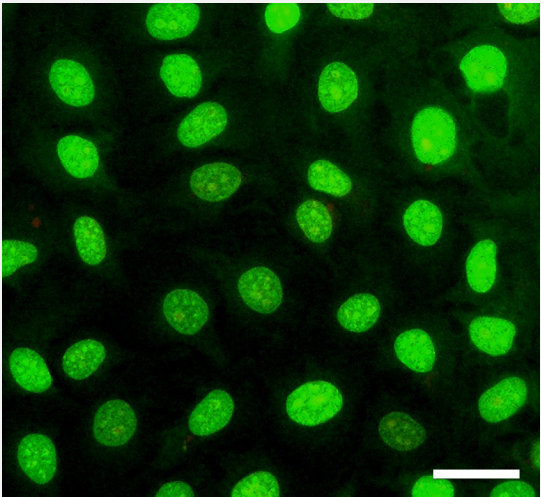
A:SKBR3 5h con NTx.
Contraste de fase



B:SKBR3 5h con NTx. EB/AO
barra: 25 μ



C:MA104 5h con NTx.
Contraste de fase



D:MA104 5h con NTx. EB/AO
barra: 25 μ

Figura 5: Efecto de las toxinas purificadas de la FI (1 μ g/ μ l, 5h) sobre SKBR3 y MA104.

Los venenos de escorpion contienen cientos de componentes con diferentes actividades farmacológicas, en especial los escorpiones de la familia Buthidae cuyos venenos pueden inducir la muerte en humanos. Sin embargo no todos los componentes son tóxicos a humanos, especialmente

aquellos de alto peso molecular, como son las toxinas que conforman la FI del veneno de *T. discrepans*. Estas inducen apoptosis a concentraciones similares o inferiores a las encontradas en otras toxinas de escorpiones (Wang and Ji, 2005; Gupta et al., 2010). Mediante inmunohistoquímica se determinó que las toxinas se unen a la membrana plasmática y que la muerte ocurre por apoptosis al inducir una sobreexpresión de FasL (D'Suze et al., 2010). La muerte celular ocurre por apoptosis debido a una serie de eventos bioquímicos nucleares codificados genéticamente relacionados con la activación de las caspasas citoplasmáticas. Apoptosis es el mecanismo de acción en el cual se basa la eficiencia de drogas antineoplásicas. Las toxinas aisladas de la FI son péptidos apoptóticos en células SKBR3 y tienen poco o ningún efecto sobre las células normales MA104. La apoptosis inducida en SKBR3 puede parecer pequeña debido al corto período de observación, pero es completamente equivalente a los efectos de paclitaxel y vinblastina estudiadas en condiciones similares, mas aún, su efecto apoptogénico fue mayor que el de paclitaxel y vinblastina. Otra droga como por ejemplo la cisplatino, comúnmente utilizada en quimioterapia induce apoptosis en células cancerígenas mediante una vía similar (Müller et al., 1997).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico de: Lic. Yoliver Higuerey, Lic. Moises Sandoval y MSc. Patricia Díaz (CBB-IV-IC). Este trabajo fué parcialmente financiado por el FONACYT de Venezuela y se agradece el apoyo de de la RedCYTED-212RTo46 (Toxinas para la Biomedicina) por su ayuda para la difusión de esta información.

BIBLIOGRAFÍA

- Batista CV, D'Suze G, Gómez-Lagunas F, Zamudio FZ, Encarnación S, Sevcik C, Possani LD. 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics* 6, 3718-3727.
- Brazón J, Guerrero B, Arocha-Piñango CL, Sevcik C,

- D'Suze G. 2008. Efecto del veneno del escorpión *Tityus discrepans* en la prueba global de coagulación. Estudios preliminares. *Investigation Clinical* 49, 49-58.
- Brazón J. 2006. Efecto sobre el sistema hemostático de componentes del veneno del escorpión *Tityus discrepans*. Tesis de Doctorado en Biología, mención Bioquímica CEA IVIC.
 - Brazón J, Hughes CE, Mori J, Sevcik C, D'suze G, Watson SP. 2011. *Tityus discrepans* scorpion venom activates platelets through GPVI and a novel Src-dependent signaling pathway. *Platelets* 22, 165-172.
 - Debin JA, Maggio JE, Strichartz GR. 1993. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology* 264, C361-369.
 - De Sousa L, Kiriakos D, Jiménez J, Michieli D, Rodríguez C, Mirabal J, Quiroga M. 1995. Accidente cerebro vascular isquémico por emponzoñamiento escorpionico: Observación clínica. *Saber*. 7, 7-14.
 - Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. 2003. Chlorotoxin inhibits glioma invasion via matrix metalloproteinase-2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 4135-4144.
 - Diego-García E, Schwartz EF, D'Suze G, González SA, Batista CV, García BI, de la Vega RC, Possani LD. 2007. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides*. 28, 31-37.
 - D'Suze G, Sevcik C, Brazón J. 2011. Fisiopatología inducida por el veneno de alacranes del género de *Tityus* de Venezuela. En: D'Suze G., Corzo G, Paniagua J. (Editores), *Emergencias por Animales Ponzoñosos en las Américas* pp 529. Edición 2011, Impreso por Documaster, SA de CV, México. pp. 31-63.
 - D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C. 2010. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon* 56, 1497-1505.
 - D'Suze G, Schwartz EF, García-Gómez BI, Sevcik C, Possani LD. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence

analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie* 91, 1010-1019.

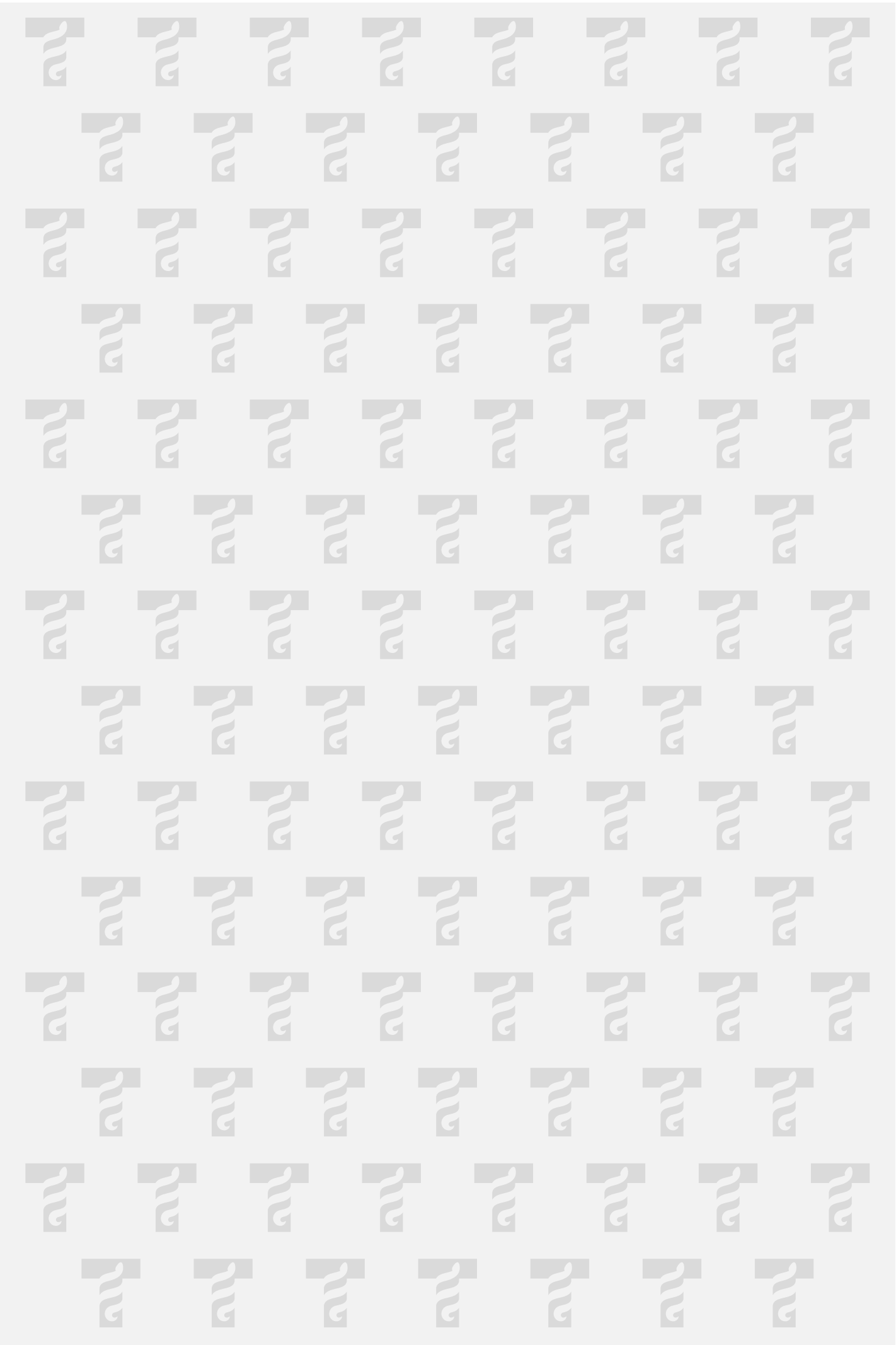
- D'Suze G, Díaz P, Salazar V, Sevcik C, Brazón J. 2007. Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 50, 1116-1125.
- D'Suze G, Salazar V, Diaz P, Sevcik C, Azpurua H, Bracho N. 2004a. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 44, 851-860.
- D'Suze G, Batista CV, Frau A, Murgia AR, Zamudio FZ, Sevcik C, Possani LD, Prestipino G. 2004b. Discrepin, a new peptide of the sub-family alpha-ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺ -channels (IA currents) of cerebellum granular cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430, 256-263.
- D'Suze G, Sevcik C, Corona M, Zamudio FZ, Batista CV, Coronas FI, Possani LD. 2004c. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 43, 263-272.
- D'Suze G, Moncada S, González C, Sevcik C, Aguila, V, Alagón A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 367-375.
- D'Suze G, Zamudio F, Gómez-Lagunas F, Possani LD. 1999. A novel K⁺ channel blocking toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *FEBS Letters* 456, 146-148.
- D'Suze G, Sevcik C, Pérez JF, Fox JW. 1997. Isolation and characterization of a potent curarizing polypeptide from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 35, 1683-1689.
- D'Suze G, Corona F, Possani LD, Sevcik C. 1996. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 34, 591-598.
- D'Suze G, Sevcik C, Ramos M. 1995. Presence of curarizing polypeptides and a pancreatitis-inducing fraction without muscarinic effects in the venom of the Venezuelan

scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon* 33, 333-345.

- Ghersy de Nieto MT, D'Suze G, Sevcik C, Salazar V, Silva V, Urbina H, Pardo R. 2004. Diabetes inducida por emponzoñamiento escorpiónico grave en un lactante de un año. *Medicrit. Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica* 16, 14-19.
- González-Sponga MA. 2011. Escorpiones, características, distribución geográfica y comentarios generales. En: D'Suze G., Corzo G, Paniagua J. (Editores), *Emergencias por Animales Ponzonosos en las Américas* pp 529. Edición 2011, Impreso por Documaster, SA de CV, México, pp. 65-114.
- Guinand A, Cortés H, D'Suze G, Díaz P, Sevcik C, González-Sponga M, Eduarte G. 2004. Escorpionismo del género *Tityus* en la sierra falconiana y su correlación con la liberación de mediadores inflamatorios y enzimas cardíacas. *Gaceta Médica de Caracas* 112, 131-138.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Gupta, S.D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., Gomes, A., 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chem. Biol. Interact.* 183, 293-303.
- Jäger, H., Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T., Grissmer, S., 2004. Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol. Pharmacol.* 65, 630–638.
- Jolly, C., Morimoto, R.L., Robert-Nicoud, M., Vourch, C., 1997. HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J. Cell Sci.* 110, 2935–2941.
- Mazzei de Davila C, Dávila DF, Donis JH, Arata de Belabarba G, Villareal V, Barboza JS. 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 40, 1339-1346.
- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Green, D.R., 1995. The end

of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Meth. Cell. Biol.* 46, 172–173.

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Methods* 65, 55–63.
- Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E.M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R., 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* 99, 403–413.
- Porras J, Rosillo M, Guirado M. 1994. Escorpionismo por *Tityus discrepans*. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* 57, 41-48.
- Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khazaeli, M.B., Sontheimer, H., 1998. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res.* 58, 4871–4879.
- Wang, W.X., Ji, Y.H., 2005. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo. *J. Neuro-Oncol* 73, 1–7.



METALOPROTEINASAS DEPENDIENTES DE ZINC: PROTAGONISTAS CENTRALES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE ENVENENAMIENTOS POR SERPIENTES DE LA FAMILIA VIPERIDAE

José María Gutiérrez*, Teresa Escalante, Alexandra Rucavado

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica
e-mail: jose.gutierrez@ucr.ac.cr

RESUMEN

Se presenta y discute el papel que juegan las metaloproteinasas de los venenos de serpientes (SVMPs) de la familia Viperidae en la fisiopatología de los envenenamientos inducidos por mordeduras de estos reptiles. Se hace especial énfasis en los mecanismos mediante los cuales estas enzimas inducen hemorragia. Así mismo, se discuten otros efectos que resultan de la acción de estas enzimas, tales como la necrosis muscular, la formación de ampollas y flictenas, y la coagulopatía. Finalmente, se analiza el rol que juegan las SVMPs en la deficiente regeneración de tejido muscular que caracteriza estos envenenamientos.

PALABRAS CLAVE: serpientes; venenos; metaloproteinasas; hemorragia, daño tisular.

ABSTRACT

The role played by snake venom metalloproteinases (SVMPs) in the pathophysiology of envenomings induced by snakes of the family Viperidae is discussed. The mechanisms involved in the ability of these enzymes to generate hemorrhage are presented, together with an analysis of other pathological effects induced by SVMPs, such as myonerosis, blistering and coagulopathy. Finally, the role played by these enzymes in the poor skeletal muscle regeneration characteristic of viperid snakebite envenomings is analyzed.

KEY WORDS: Snakes; venoms; metalloproteinases; hemorrhage; tissue damage.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes constituyen secreciones de enorme complejidad bioquímica, con una alta concentración de proteínas, muchas de las cuales presentan efectos tóxicos que les permiten a las serpientes inmovilizar a sus presas y, en algunos casos, efectuar una predigestión de las mismas. Los estudios proteómicos de venenos de serpientes han revelado la existencia de una gran cantidad de proteínas, las cuales sin embargo se pueden clasificar en un número limitado de familias (Calvete, 2011). Los venenos de serpientes de la familia Viperidae presentan, en general, una alta concentración de metalloproteinases dependientes de zinc (en inglés 'snake venom metalloproteinases', SVMPS). Estas SVMPS pertenecen a la familia M12 de las metalloproteinases, junto con las ADAMs ('a disintegrin and metalloproteinase'), con las cuales forman la subfamilia de las 'reprolisinas' (Fox y Serrano, 2005), las cuales a su vez forman parte de las 'metzincinas', junto con las astacinas, seralisinas y metalloproteinases de matriz. Las metzincinas se caracterizan por presentar una secuencia consenso en el sitio catalítico (HExxHxxGxxH) y luego una región conteniendo un residuo de metionina ('Mettur').

Las SVMPS juegan un papel central en las dos funciones principales de los venenos, esto es, en la inmovilización y muerte de las presas y en la predigestión (Gutiérrez et al., 2010). Además de su actividad digestiva, las SVMPS ejercen una serie de efectos tóxicos relevantes, entre los que destacan su actividad hemorrágica, su capacidad para generar necrosis como consecuencia de la isquemia, su actividad procoagulante, la inhibición de la agregación plaquetaria y la degradación de la matriz extracelular, entre otros efectos (Gutiérrez et al., 2010). Dada la relevancia de estas enzimas en los venenos de vipéridos, diversos grupos han avanzado en la caracterización molecular de estas proteinases y en la comprensión de los mecanismos mediante los cuales provocan alteraciones fisiopatológicas y patológicas. El presente trabajo resume algunos de estos hallazgos.

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS SVMPS

Las SVMPS difieren notoriamente en sus masas moleculares, las cuales van desde 22 kDa hasta más de 70 kDa (Fox y Serrano, 2005). Esta heterogeneidad se debe a las variaciones en la composición de dominios de estas enzimas. Todas las SVMPS presentan, en su proteína madura, un dominio metaloproteínasa, el cual contiene la secuencia de unión a zinc y el bucle donde se encuentra la metionina. Las SVMPS que presentan únicamente este dominio se clasifican en la clase PI. Algunas SVMPS presentan, además del dominio metaloproteínasa, un dominio disintegrina, constituyendo la clase PII. En muchos casos este dominio disintegrina es liberado como consecuencia de la acción proteolítica, aunque unas pocas SVMPS presentan los dos dominios en la proteína madura (Fox y Serrano, 2005). Las SVMPS clasificadas en la clase PIII contienen, además del dominio metaloproteínasa, un dominio tipo-disintegrina y un dominio rico en cisteína. Dentro de esta clase PIII hay algunas enzimas que presenten una subunidad adicional, una proteína tipo lectina tipo C, unida a la cadena con tres dominios mediante puentes disulfuro. Dentro de las clases PII y PIII existen varias subclases dependiendo de si se trata de proteínas dimericas o con base en otras características (Fox y Serrano, 2005). Se conoce la estructura 3D de una serie de SVMPS de la clase PI y de algunas SVMPS de la clase PIII, las cuales se disponen en forma de C, con el dominio rico en cisteína ubicado cerca del dominio catalítico (Escalante et al., 2011b). Se ha propuesto que la evolución molecular de las SVMPS se basa en el ‘reclutamiento’ ancestral de un gen que codifica para una ADAM, seguido de un proceso evolutivo molecular basado en pérdida de dominios, evolución acelerada y neofuncionalización de los dominios remanentes (Casewell et al., 2011). SVMPS de la clase PIII han sido aisladas de venenos de serpientes de las familias Viperidae, Elapidae, Atractaspididae y Colubridae (sensu lato), en tanto SVMPS de las clases PII y PI solamente se han descrito en venenos de la familia Viperidae (Gutiérrez et al., 2010).

ACTIVIDADES TÓXICAS DE LAS SVMPS

La actividad tóxica más estudiada de las SVMPs es su capacidad para inducir hemorragia, tanto a nivel local como sistémico. Este efecto acarrea consecuencias fisiopatológicas variadas y complejas, ya que contribuye a la patología local del envenenamiento, asociada con la destrucción de tejido, que lleva frecuentemente a secuelas permanentes, y con alteraciones hemodinámicas severas que pueden culminar en un choque cardiovascular (Gutiérrez et al., 2005). Pero además, las SVMPs son capaces de inducir necrosis muscular, probablemente como consecuencia de la isquemia resultante de la destrucción microvascular (Gutiérrez et al., 1995). Además, inducen formación de flictenas (Jiménez et al., 2008) y contribuyen con las coagulopatías características de envenenamientos por vipéridos, ya que hay SVMPs que activan el factor X de la coagulación y la protrombina, generando la formación de microtrombos, con la consecuente desfibrinogenación y alteración de las pruebas de coagulación (Gutiérrez et al., 2010). Algunas SVMPs de la clase PIII son capaces de inhibir la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y otros agonistas (Kamiguti, 2005). Por otra parte, las SVMPs contribuyen con la inflamación característica de la acción de estos venenos (Teixeira et al., 2005).

MECANISMO DE ACCIÓN DE SVMPS HEMORRÁGICAS

Los estudios ultraestructurales han demostrado que las SVMPs hemorrágicas provocan lesiones drásticas en los vasos capilares muy rápidamente después de la inyección en animales de laboratorio (Gutiérrez et al., 2005). Los capilares afectados presentan evidentes alteraciones tanto en las células endoteliales como en la membrana basal (MB). En el caso de las células endoteliales, estas disminuyen el número de vesículas pinocitóticas, se distienden y adelgazan y, eventualmente, se rompen (Gutiérrez et al., 2005, 2006). La estructura de la MB se altera, con pérdida de su integridad y de su continuidad. Cuando se analiza este efecto mediante inmunohistoquímica, con anticuerpos contra los componentes de la MB, se observa una clara pérdida de tinción para

laminina, nidogen y colágeno tipo IV (Escalante et al., 2006). No obstante el conspicuo efecto patológico observado en las células endoteliales de los vasos capilares in vivo, cuando líneas de endotelio son expuestas in vitro a SVMPs hemorrágicas, no ocurre efecto citotóxico agudo equivalente a lo que se observa in vivo. Lo que se observa es un despegue de las células de su sustrato, seguido, varias horas después, por muerte celular apoptótica (Díaz et al., 2005).

La discrepancia descrita entre las observaciones in vivo e in vitro se pueden explicar mediante una hipótesis que plantea que la hemorragia inducida por las SVMPs ocurre en dos pasos: inicialmente las enzimas actúan sobre sustratos ubicados en la MB, resultando en un debilitamiento de la estabilidad mecánica que dicha MB provee a la estructura de los vasos capilares. Como consecuencia de dicho debilitamiento, in vivo, se desencadena el segundo paso del proceso: las fuerzas biofísicas que normalmente operan en la vasculatura (presión hidrostática y fuerzas de cizalla o shear stress) provocan una distensión en el capilar debilitado, lo cual lleva eventualmente a la ruptura de la célula endotelial y la consecuente extravasación (Gutiérrez et al., 2005, 2006, 2010). Al no operar estas fuerzas biofísicas in vitro, esto explica la ausencia de patología directa sobre el endotelio en cultivo celular.

En el contexto de esta hipótesis, es interesante preguntarse por qué algunas SVMPs son hemorrágicas y otras no, tomando en cuenta que todas son generalmente capaces de hidrolizar proteínas de la MB. Una posible respuesta a esta incógnita fue presentada por Escalante et al. (2011a y 2011b). Cuando se estudiaron los patrones de degradación in vitro e in vivo sobre proteínas de la MB como consecuencia de la acción de una SVMP hemorrágica y una no hemorrágica se observó que, aunque ambas hidrolizaban de manera similar la laminina y el nidogen, la SVMP hemorrágica fue mucho más efectiva en la hidrólisis del colágeno tipo IV y del proteoglicano perlecan (Escalante et al., 2011a). Estas observaciones se relacionan con el hecho de que precisamente el colágeno tipo IV y el perlecan juegan un papel central en la estabili-

dad mecánica de los vasos capilares. Por ende, una hidrólisis de estos componentes redundaría en un debilitamiento mecánico de la MB en particular y de la pared vascular en general, lo cual encaja muy bien con la hipótesis de los dos pasos para explicar el mecanismo de acción de las SVMPs hemorrágicas.

La base estructural de la diferente capacidad de SVMPs de la clase PI para inducir hemorragia no se conoce a cabalidad. No obstante, Wallnoefer et al. (2010), al comparar mediante simulaciones dinámicas SVMPs hemorrágicas y no hemorrágicas, observaron que existen diferencias en la dinámica molecular de un bucle localizado en la vecindad del sitio activo de estas enzimas. Las SVMPs hemorrágicas presentan más flexibilidad en una parte de ese bucle, en tanto las no hemorrágicas la presentan en otra región.

¿POR QUÉ LAS SVMPs DE LA CLASE PIII SON MÁS HEMORRÁGICAS QUE LAS DE LA CLASE PI?

Consistentemente se ha observado que las SVMPs hemorrágicas de la clase PIII son mucho más activas en su capacidad de inducir hemorragia que las de la clase PI. Dado que las primeras tienen una estructura multidominio, se ha planteado que los dominios adicionales (tipo disintegrina y rico en cisteína) son responsables de dicho fenómeno. Estos dominios poseen exositos que les permiten a las SVMPs PIII ligarse a blancos celulares y de la matrix extracelular que las ubican en sitios estratégicos para lesionar la microvasculatura, en la vecindad de la MB o de las células endoteliales. Al carecer de esos exositos, por tener únicamente un dominio metaloproteínasa, las SVMPs de la clase PI tienen una acción más promiscua y menos dirigida a blancos estratégicos para generar lesión microvascular (Gutiérrez et al., 2005). Por otra parte las SVMPs PIII son resistentes a la acción inhibitoria de la α 2-macroglobulina, una proteína plasmática de alta masa molecular que inhibe diversos tipos de proteinasas; por el contrario, las SVMPs de la clase PI son inhibidas por la α 2-macroglobulina (Baramova et al., 1990; Gutiérrez et al., 2005). La razón por la cual las SVMPs PIII resisten la in-

hibición por esta proteína plasmática no se conoce a cabalidad; se ha planteado que la misma se basa en un impedimento estructural generado por los dominios adicionales tipo disintegrina y rico en cisteína. La ausencia de inhibición por la $\alpha 2$ -macroglobulina explicaría por qué las SVMPs PIII son capaces de inducir hemorragia sistémica, en tanto las PI generan fundamentalmente hemorragia local, ya que al ingresar a la circulación son inhibidas por esta proteína plasmática. Finalmente, podría ser que la mayor actividad hemorrágica de las SVMPs PIII se relacione con su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria, contribuyendo así al sangrado generado por la hidrólisis de las proteínas de la MB (Gutiérrez et al., 2005; Kamiguti, 2005).

LA ACCIÓN DE LAS SVMPs EN LA PIEL

Uno de los efectos patológicos que se observa con frecuencia en pacientes envenenados por serpientes de la familia Viperidae es la formación de ampollas o flictenas en la región donde es inyectado el veneno. Los estudios experimentales han mostrado que este efecto es reproducido en ratones mediante inyección con SVMPs purificadas (Jiménez et al., 2008). Se ha postulado que esta lesión es consecuencia de la degradación proteolítica de componentes de la MB que forma la interfase entre la epidermis y la dermis, lo cual ha sido evidenciado mediante inmunohistoquímica (Jiménez et al., 2008; Escalante et al., 2009). El análisis del exudado colectado a nivel subcutáneo en ratones inyectados con una SVMP mostró la presencia de diversas proteínas de la matriz extracelular, así como de queratinas (Escalante et al., 2009, 2011a).

LAS SVMPs Y EL PROBLEMA DE LA DEFICIENTE REGENERACIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por una severa necrosis muscular local. En muchos pacientes, esta necrosis no es seguida por un proceso adecuado de regeneración muscular, por lo que se generan secuelas permanentes asociadas a pérdida de masa y función muscular, con un alto impacto en la calidad de vida de

estas personas. Las razones por las cuales está afectado el proceso de regeneración muscular se ha investigado a nivel experimental. Se ha observado que, cuando se inyectan toxinas que inducen mionecrosis, pero que no afectan la microvasculatura, la regeneración se desarrolla de manera exitosa (Hernández et al., 2011). Sin embargo, cuando los ratones son inyectados con una mezcla de miotoxinas y SVMPs hemorrágicas, o cuando se inyecta veneno total, la regeneración es deficiente (Hernández et al., 2011). Dado que el proceso de regeneración muscular depende de una adecuada perfusión sanguínea al tejido en regeneración, se ha postulado que la destrucción de la microvasculatura por las SVMPs hemorrágicas afecta drásticamente la regeneración (Hernández et al., 2011). Además, es probable que las SVMPs también afecten las fibras nerviosas de los nervios periféricos que llegan al músculo, contribuyendo de esta manera en la inadecuada regeneración (Hernández et al., 2011).

CONCLUSIONES

Las SVMPs juegan un papel clave en la fisiopatología de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, al contribuir de manera directa con la patología local y sistémica de dichos envenenamientos. Pese a que se ha avanzado de manera significativa en la comprensión de la estructura y mecanismo de acción de las SVMPs, aún permanecen muchas incógnitas relacionadas con los determinantes estructurales de la toxicidad y con los mecanismos mediante los cuales estas enzimas generan lesión tisular e inflamación. Así mismo, desde la perspectiva terapéutica, es muy importante descubrir y desarrollar inhibidores de estas enzimas, los cuales puedan ser utilizados como complemento a los antivenenos en el tratamiento de los envenenamientos por mordeduras de serpientes.

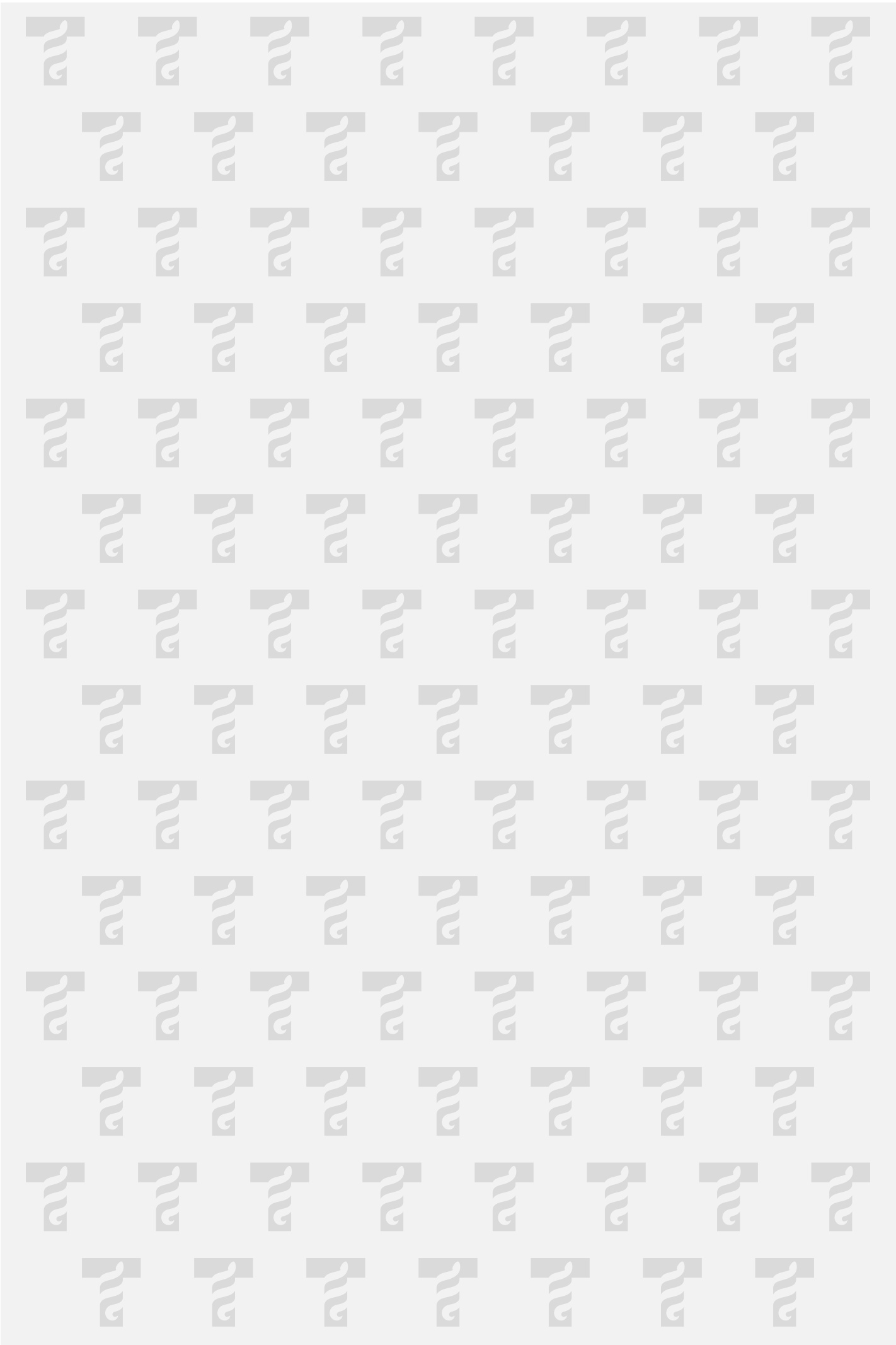
AGRADECIMIENTOS

Algunos de los estudios discutidos en este trabajo han sido financiados por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, por la red NeTropica y por el Wellcome Trust.

BIBLIOGRAFÍA

- Baramova, E.N., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Gonias, S.L., Fox, J.W., 1990. Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human α 2-macroglobulin. *Biochemistry* 29, 1069-1074.
- Calvete, J.J., 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev. Proteomics* 8, 739-758.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2637-2649.
- Díaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2005. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 94, 520-528.
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson M., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011a. Role of collagen and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS ONE* 6, e28017.
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011b. Key events in microvascular damage induced by snake venom metalloproteinases. *J. Proteomics* 74, 1781-1794.
- Escalante, T., Rucavado, A., Pinto, A.F.M., Terra, R.M.S., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2009. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J. Proteome Res.* 8, 5120-5131.
- Escalante, T., Shannon, J.D., Moura-da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2006. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. *Arch. Biochem. Biophys.* 455, 144-153.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.

- Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Escalante, T., Rucavado, A., 2006. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microvasc. Res.* 71, 55-63.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., 2010. Snake venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. In: Mackessy, S.P. (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, pp. 115-138.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.
- Jiménez, N., Escalante, T., Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2008. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage, revascularization and re-epithelization in a mouse ear model. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2421-2428.
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041-1049.
- Teixeira, C.F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., Zamuner, S.F., 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memorias Inst. Oswaldo Cruz* 100 (Suppl. 1), 181-184.
- Wallnoefer, H.G., Lingott, T., Gutiérrez, J.M., Merfort, I., Liedl, K.R., 2010. Backbone flexibility controls the activity and specificity of a protein-protein interface: Specificity in snake venom metalloproteases. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10330-10337.



PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS DE *Stichodactyla helianthus* Y SUS APLICACIONES EN LA BIOMEDICINA

María Eliana Lanio^{a*}, Fabiola Pazos^a, Rosangela Itri^b, Shirley Schreier^c, Luis E. Fernández^d, Carlos Álvarez

^aCentro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba;

^bDepartamento de Física Aplicada, Instituto de Física, Universidad de São Paulo, Brasil;

^cLaboratorio de Biología Estructural, Instituto de Química, Universidad de São Paulo, Brasil;

^dCentro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

*e-mail: mlanio@fbio.uh.cu

RESUMEN

Sticholysinas (Sts) I y II (StI/II) son toxinas formadoras de poros producidas por la anémona *Stichodactyla helianthus*, pertenecientes a la familia de proteínas actinoporinas. Sts carecen de cisteínas y exhiben una preferencia por membranas que contienen esfingomielina (EM). La actividad funcional de las Sts depende de la naturaleza físico-química de las membranas. La presencia de EM y colesterol o de lípidos que favorecen una estructura no-lamelar potencia el enlace y la formación de poros por estas toxinas. Mutantes de StI que incluyen un residuo de cisteína en regiones funcionalmente relevantes exhibieron diferentes habilidades para formar dímeros estabilizados por un puente disulfuro. La existencia de una población de dímeros de StI E2C potencia la actividad formadora de poros de este mutante, si se compara con la proteína en estado monomérico, lo que sugiere que el pre-ensamblaje de las sticholysinas, a través de la región N-terminal, facilita la formación de poros. En este trabajo, además, se describen algunos resultados obtenidos por nuestro grupo en los estudios de la interacción

sticholysinas-membrana empleando diferentes modelos de membranas, tales como los liposomas unilamelares gigantes. Se comentan algunos de los resultados obtenidos en la construcción de inmunotoxinas basadas en Sts y en los estudios de las propiedades inmunomoduladora de estas toxinas encapsuladas en liposomas.

ABSTRACT

Sticholysins (Sts) I and II (StI/II) are pore-forming proteins produced by the anemone *Stichodactyla helianthus* belonging to the protein family actinoporin. Sts are cysteine-less proteins with a preference for sphingomyelin(SM)-containing membranes. The functional activity of Sts is critically dependent on the physicochemical nature of the membrane. The presence of SM and cholesterol or lipids favoring a non-lamellar structure promotes binding and pore formation. Mutants of StI including a cysteine residue in relevant functional regions exhibited different ability to form dimeric structure stabilized by a disulfide bond. The presence of a dimerized population of the StI E2C mutant enhances pore-forming activity in comparison with the protein in the monomeric state, suggesting that pre-ensemble of sticholysins through the N-terminal region facilitates the pore formation. Here we additionally describe some results obtained by our group in the studies of sticholysins-membrane interaction using different membrane models, such as giant unilamellar liposomes. We comment some results obtained in the construction of immunotoxins based on Sts and the studies about immunomodulating properties of these toxins carried by liposomes.

PALABRAS CLAVES: sticholysinas, toxinas formadoras de poros, liposomas

STICHOLYSINAS I Y II, DOS PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS- PRODUCIDAS POR LA ANEMONA *Stichodactyla helianthus*

Las citolisinas son proteínas que producen la lisis de las células al interactuar con sus membranas citoplasmáticas. Cuando esta acción lítica es debido a la formación de poros en membranas son denominadas porinas o proteínas formadoras de poros (PFP). Sticholysinas I y II (StI y StII) son PFP purificadas de la anémona *Stichodactula helianthus* que poseen elevados pI con masas moleculares de aproximadamente 20 kDa, carentes de residuos de cisteínas y una estructura organizada predominantemente en hoja beta (Lanio et al., 2001; Martínez et al., 2001; Menestrina et al., 1999). Ambas toxinas exhiben una elevada homología e identidad en sus secuencias aminoacídicas (Huerta et al., 2001) y forman poros oligoméricos (3-4 monómeros) en membranas modelos y naturales, con un diámetro hidrodinámico aproximado de 2 nm (Tejuca et al., 2001). Debido a sus propiedades funcionales y por ser obtenidas del orden Actiniaria, StI y StII han sido incluidas en la familia de PFP, más numerosas y estudiadas, conocidas como Actinoporinas (Kem, 1998). Las estructuras 3D en solución de equinatoxina II (EqTII) de la anémona *Actinia equina* (EqTII), de StII (Figura 1) y de fragaceatoxina C (FraC) de la anémona *Actinia fragacea* (FraC) han sido resueltas en sus conformaciones solubles por cristalografía y difracción de rayos-X (Athanasiadis et al., 2001; Mancheño et al., 2003; Mechaly et al., 2011). La resonancia magnética nuclear (RMN) también fue utilizada para determinar la estructura 3D de EqTII y StI (Hinds et al., 2002; Castrillo et al., 2009). La elevada similitud estructural entre EqTII, FraC, StII y StI permite identificar los siguientes elementos estructurales comunes (Figura 1): un núcleo central de hojas- β en un plegamiento de sándwich- β , un sitio de unión interfacial (SUI) resuelta a partir de la estructura 3D del complejo StII-fosfocolina (POC, Mancheño et al., 2003) y dos hélices α , orientadas perpendicularmente una con relación a la otra en caras opuestas del sándwich- β . La primera hélice α , próxima al extremo amino, posee características anfipáticas y se ha sugerido que puede separarse del sándwich- β sin producir

grandes cambios estructurales en la proteína durante la interacción con membranas. La segunda hélice α se encuentra formando parte del SUI (Athanasiadis et al., 2001; Mancheño et al., 2003; Mechaly et al., 2011).

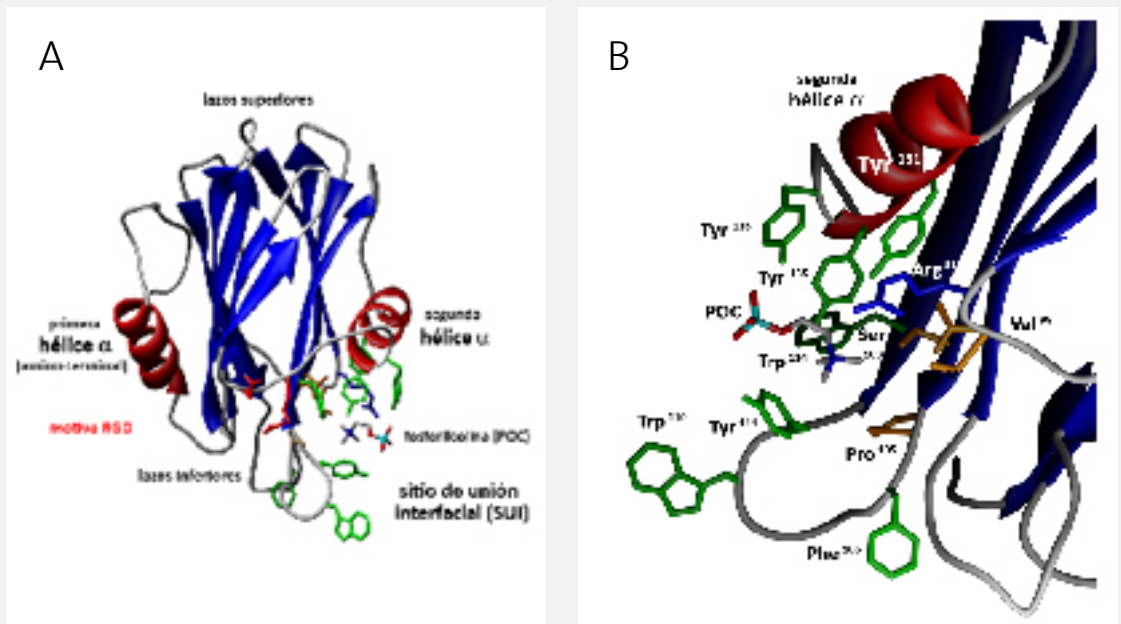


Figura 1: Estructura de Sticholysina II

(A) Representación en cintas de la estructura de StII (PDB: 1O72-A). Los segmentos en rojo representan las hélices α , en azul las hojas β y en gris los giros β y lazos. La molécula de fosforilcolina (POC) se encuentra representada en la cavidad de su sitio de unión.

(B) Sitio de unión interfacial (SUI). Las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el sitio de unión a POC y la agrupación de aminoácidos aromáticos se encuentran representados de la siguiente manera: en verde, los hidrofóbicos (Phe106, Tyr111, 131, 135, 136 y Trp110, 114), en naranja los hidrofílicos (Ser52, 103, Val85 y Pro105). En azul se representa la cadena lateral de la Arg51 que pudiera contribuir a estabilizar el grupo fosfato de POC (Mancheño et al., 2003).

INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD FORMADORA DE POROS DE LAS STICHOLYSINAS

Existen diferentes interpretaciones sobre la función de los lípidos en la interacción de las actinoporinas con las membranas. Cada paso consecutivo en el complejo proceso de formación de poros pudiera ser influido por una única característica de la molécula lipídica, una combinación de su propiedades o por parámetros físicos que se originan de la naturaleza de los lípidos en las membranas (Anderluh

y Macek, 2002). Diferentes propiedades de las membranas modifican el enlace-inserción a la membrana y la formación del poro por las PFP, tales como el parámetro de orden de las cadenas de ácidos grasos, la constante dieléctrica y el espesor (Macek et al., 1997), la transición de fase gel a líquido cristalino (Poklar et al., 1999), defectos estructurales con la aparición de microdominios (Barlic et al., 2004) y la curvatura de la membrana (Macek et al., 1994; Alvarez-Valcarcel et al., 2001).

Para las actinoporinas se ha demostrado que la capacidad lítica depende de la presencia de EM en las membranas por lo que se ha propuesto que este lípido constituye un receptor para estas PFP, favoreciendo el enlace irreversible y la formación de poros en membranas modelos (Alvarez-Valcarcel et al., 2001; Martínez et al., 2007). En efecto, vesículas unilamelares grandes (LUV) constituidas por mezclas equimolares de fosfatidilcolina (PC) y EM han sido las mejores blancos de la actividad permeabilizante de las sticholysinas (Tejuca et al., 1996; Alvarez-Valcarcel et al., 2001). Al parecer las actinoporinas reconocen la EM a nivel de grupo polar y de la cermida (Macek et al., 1994). Teniendo en cuenta la existencia de un sitio de enlace de POC en las actinoporinas (Mancheño et al., 2003), un problema aún no resuelto es la naturaleza de los elementos estructurales que permiten que estas proteínas discriminen entre EM y PC.

En LUV exclusivamente constituidos por PC y colesterol (chol) StII forma poros aún cuando esta toxina exhibe una baja asociación con estos lípidos (De los Ríos et al., 1998; Martínez et al., 2007). Sin embargo, la presencia de EM y chol en la membrana favorece significativamente el enlace y la actividad de permeabilización de StII (Martínez et al., 2007). Mezclas de PC, EM y chol pueden formar los así llamados microdominios, los cuales difieren en sus propiedades físico-químicas del resto de la estructura de membrana, predominando una fase semejante a la líquido-ordenada rodeada de una fase líquido desordenada (Simons y Vaz, 2004). El enlace y la formación de poros por las actinoporinas resulta notablemente potenciado frente a estas mezclas ternarias que

presumiblemente presentan estos microdominios (Barlic et al., 2004; Alegre-Cebollada et al., 2006; Martinez et al., 2007). La influencia de otros lípidos sobre la actividad funcional de StI y StII también ha sido estudiada. Alvarez-Valcárcel et al. (2001) demostraron que la inclusión de una pequeña proporción (5 %) de un fosfolípido cargado negativamente en LUV de PC:EM potencia la actividad permeabilizante de las sticholysinas. De manera interesante, similar efecto booster fue observado con lípidos zwiterionicos y en una menor extensión con el lípido cargado positivamente estearilamina, lo que era indicativo que este efecto no era el resultado de interacciones electrostáticas entre las sticholysinas y la superficie negativa de las vesículas. Un resultado relevante que posibilitó sugerir la formación por estas toxinas de un poro toroidal en las membranas liposomales, fue el hallazgo de que estas proteínas eran capaces de propiciar un incremento del movimiento flip-flop o transbicapa de los lípidos en estas membranas, lo que era indicativo de una disrupción local de la estructura de bicapas. De manera, que es posible que la presencia de cantidades pequeñas de lípidos que favorecen esta organización no-lamelar pudiera también aumentar la eficiencia de formación de poros. Espectros de resonancia paramagnética electrónica de sondas espín obtenidos con liposomas que contienen ácidos grasos con un nitróxido en diferentes posiciones de la cadena hidrocarbonada y en presencia de StII, han demostrado la no interacción de la proteína con los grupos metilenos más cercanos al grupo metilo terminal, lo cual pudiera justificarse por la estructura de un poro toroidal (Alvarez et al., 2003). La estructura del poro formado por las actinoporinas no ha sido visualizada, pero el conjunto de las cuatro hélices- α que lo forman son relativamente más pequeñas que las dimensiones experimentales del poro (diámetro ~ 2 nm) (Tejuca et al., 1996; Álvarez et al., 2001; Kristan et al., 2009). Esto apoya el hecho de que las paredes del poro deberían estar formadas no sólo por las hélices- α de los monómeros, sino también por las cabezas polares de los lípidos de las membranas (Álvarez et al., 2001 y 2003; Anderluh y Maček, 2003).

Sin embargo, recientemente a partir de los estudios realizados con FraC mediante cristalografía en presencia de detergente y difracción de rayos X, ha sido sugerida la existencia de un poro oligomérico en forma de corona formado por nueve monómeros (Mechaly et al., 2011). Los estudios de criomicroscopía electrónica de la FraC en presencia de vesículas liposomales compuestas de cantidades equimolares de PC y SM y con el empleo de la estructura 3D cristalográfica de esta toxina, permitieron modelar la estructura de un poro cónico en forma de embudo formado por nueve monómeros cuyas paredes del canal están constituidas exclusivamente por nueve hélices- α y cuyo diámetro interno coincide con el ya previamente informado. En los próximos años se deberán desarrollar estrategias experimentales para validar uno de los dos modelos, poro toroidal o poro cónico, con el empleo de las diferentes actinoporinas cuya estructura 3D se encuentra resuelta y en escenarios lipídicos diferentes.

LIPOSOMAS UNILAMELARES GIGANTES (GUV), CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN STICHOLYSINAS-MEMBRANA

Las vesículas unilamelares gigantes (GUV) constituyen otra excelente herramienta para el estudio de la interacción de moléculas bioactivas con membranas modelos, como es el caso de las actinoporinas. Las GUV son del orden de tamaño de las células (10 a 100 μm) y pueden ser observadas por microscopía óptica. De manera análoga a otras vesículas liposomales, es posible investigar el papel de los lípidos en la interacción sticholysinas-membrana, modificando la composición de las bicapas lipídicas de las GUV. Las GUV pueden ser formadas encapsulando un interior acuoso que contiene sacarosa y dispersadas en una solución de glucosas de la misma osmolaridad, para evitar efectos osmóticos. Esta asimetría de los azúcares origina un contraste óptico debido a los índices de refracción de la luz diferentes de cada azúcar. En la figura 2A se muestra un conjunto de GUV observadas por microscopía óptica en el modo de contraste de fase, en tanto en la figura 2B se representan las GUV después de 15 minutos de la adición de 3 nM de StI. Es posible obser-

var claramente una pérdida de contraste óptico de las GUVs, debido a la formación de poros en la membrana, lo que posibilita el intercambio entre el medio interno y externo de las vesículas.

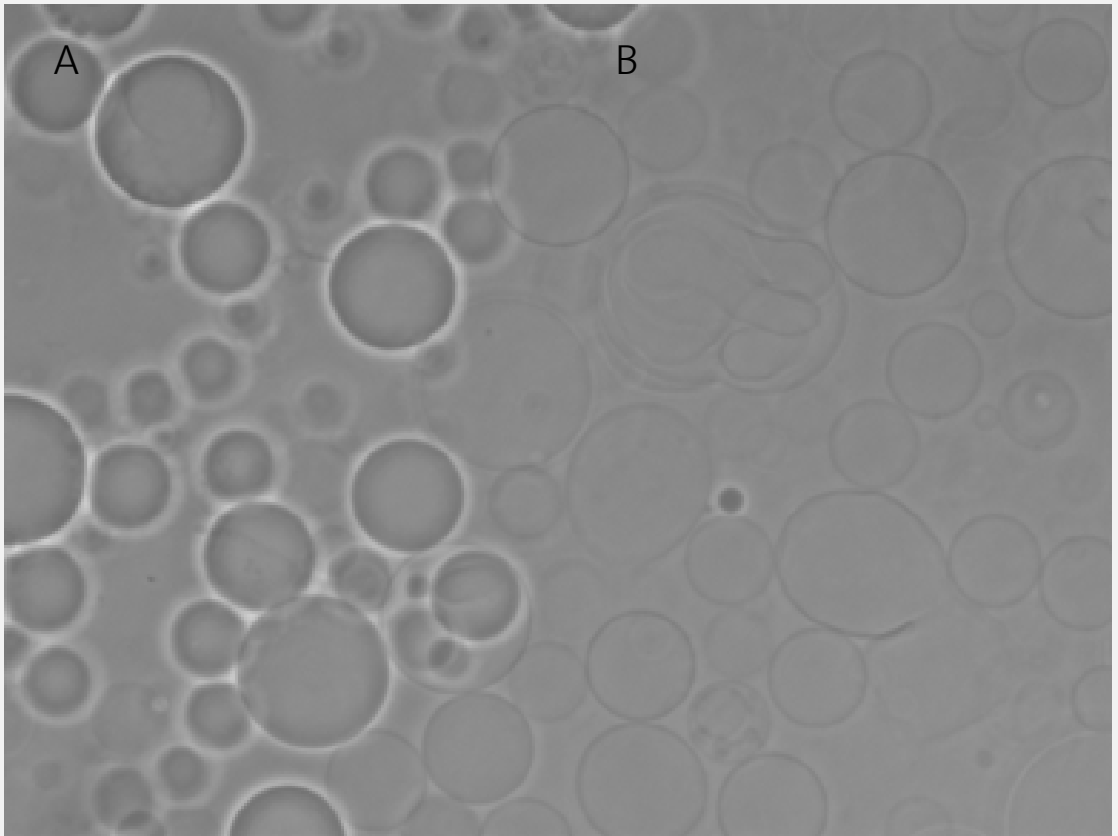


Figura 2: Efecto de StI sobre GUV constituidas por palmitoiloleil PC (POPC):EM:Chol (15:50:35) observadas en el modo de contraste de fase

(A) GUV en ausencia de StI

(B) GUV después de 15 minutos de la adición de 3 nM de StI, evidenciando una completa pérdida de contraste óptico de las GUV debido a la formación de poros.

Actualmente, estamos investigando la cinética de formación de poros de StI y StII mediante la pérdida del contraste óptico de las GUV compuestas por POPC, EM y Chol en diferentes proporciones, con el propósito de estudiar la relevancia de la presencia de EM y Chol en el modo de acción de estas toxinas. Adicionalmente, con el empleo de las GUV se ha podido investigar la acción de las sticholysinas en liposomas cuya composición lipídica presenta coexistencia de fases Ld-Lo. En la figura 3 se presentan GUV después de la adición de 3 nM

de StI: (A) modo de fluorescencia, destacando los dominios Ld-Lo; (B) el mismo conjunto de GUV en el modo de contraste de fase evidenciando una pérdida de contraste óptico. Estos resultados indican que StI es capaz de formar poros en la membrana, sin modificar la coexistencia de fases Ld-Lo.

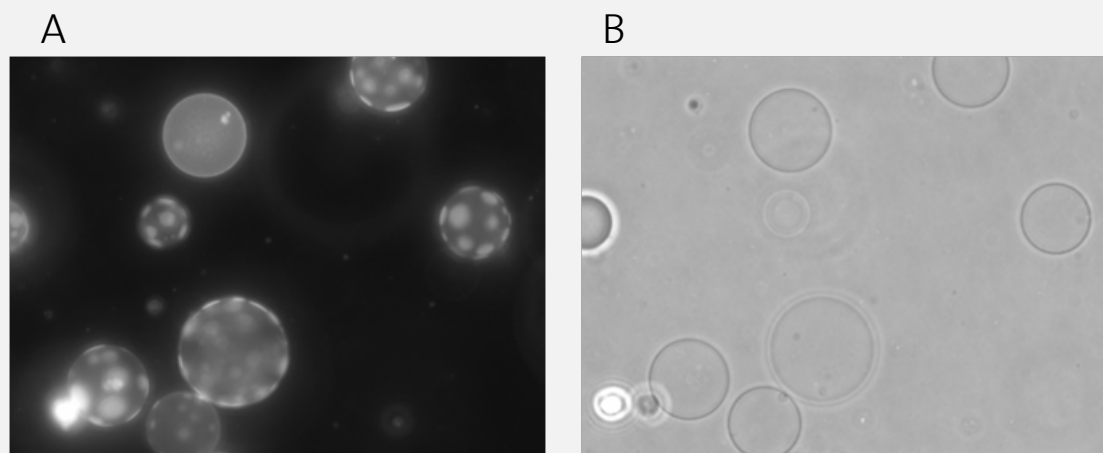


Figura 3:GUVsconstituídas por dioleil PC (DOPC):EM:Chol (1:1:1) en presencia de 3 nM de StI

(A)modo de fluorescencia

(B) modo de contraste de fase

MUTANTES DE CISTEÍNA DE STICHOLYSINA I, UNA ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LAS STICHOLYSINAS.

El laboratorio de Toxinas y Liposomas del CEP-UH ha diseñado y obtenido mutantes a partir de Sticholysina I recombinante (StIr) (Pazos et al., 2006), que contienen un residuo de cisteína en posiciones funcionalmente importante para las actinoporinas: el dominio rico en aminoácidos aromáticos que forma parte del SUI de las actinoporinas y que interactúa con la membrana (Hong et al., 2002; Mancheño et al., 2003) (StIR52C y StI W111C) y el segmento N-terminal, probablemente involucrado en la formación del poro (Malovrh et al., 2003) (StIE2C y StIF15C). Estas mutantes de cisteína constituyen una herramienta valiosa para el estudio de la relación estructura-función de las actinoporinas y además, permiten el marcaje de estas toxinas mediante la introducción de sondas de espin y sondas fluorescentes para el estudio de

la interacción con membranas mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica y espectroscopia de fluorescencia.

Aproximadamente el 80% de los mutantes obtenidos de EqtlI y StII son simples o dobles mutantes de cisteína cuya caracterización funcional ha permitido analizar la importancia de diferentes residuos aminoacídicos para la unión a las membranas y la formación de los poros (Malovrh et al., 2003; Hong et al., 2002; Gutiérrez-Aguirre et al., 2004; Kristan et al., 2007; Alegre-Cebollada et al., 2008). Los mutantes de cisteína de StIr se obtuvieron mediante reacción en cadena de la ADN polimerasa usando como molde el vector pET3a-stIr. Se expresaron en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y se purificaron según Pazos et al. (2006) y Valle et al. (2011). La caracterización conformacional realizada mediante espectroscopia de dicroísmo circular y espectroscopia de fluorescencia demostró que las sustituciones de Glu², Phe¹⁵, Arg⁵² y W¹¹¹ por cisteína no modifican las características conformacionales de StIr (Valle et al., 2001; López et al., 2011).

La introducción de residuos de cisteína en estas moléculas favorece la formación de dímeros mediante puentes disulfuro. La agregación dimérica en estas mutantes depende de la orientación estructural óptima de los residuos de cisteína, sus grados de exposición a la superficie molecular y la reactividad de sus grupos sulfhidrilos (Creighton, 1988). StI W¹¹¹C presenta una elevada tendencia a dimerizar (aproximadamente más de un 90% en solución), lo cual pudiera estar relacionado con el elevado nivel de exposición del residuo W¹¹¹ en la molécula. StI W¹¹¹C conserva elevada actividad hemolítica mientras que la molécula dimérica pierde su actividad formadora de poros debido a la imposibilidad de unirse a la membrana (Penton et al., 2011). La tendencia a dimerizar del resto de las toxinas fue StIE₂C > StIR₅₂C > StIF₁₅C, con una dependencia de la concentración de la proteína en solución (Valle et al., 2011).

El residuo Phe¹⁴ de StII, que corresponde al residuo Phe¹⁵ de StI, participa en la estabilización de la unión del N-terminal al núcleo central de hojas- β (Alegre y Cebollada, 2004). La

introducción del residuo de cisteína en StlF15C provocó cambios en su capacidad de interacción con modelos de membranas, sin embargo, no afectó la capacidad de formación de poros del mutante, por lo que este residuo aminoacídico pudiera ser importante en las etapas iniciales de interacción de las sticholysinas con las membranas (Valle et al., 2011).

Mancheño et al., (2003) plantearon que en StII el residuo Arg⁵¹ se encuentra localizado próximo al sitio de unión de POC dentro del SUI y pudiera estabilizar la unión de la proteína a la membrana mediante interacciones de tipo electrostático con la carga negativa de POC. La sustitución de Arg⁵² por cisteína en StIr no modificó su capacidad de interacción con las monocapas lipídicas y SUV pero disminuyó su actividad formadora de poros. Estos resultados indican que la Arg⁵² es importante para las etapas subsiguientes a la unión de la toxina a la membrana y que conducen a la formación de un poro funcional (Valle et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron cuando se sustituyó la Ser⁵⁴ de EqTII por cisteína lo cual provocó una disminución de su actividad hemolítica sin modificación de la unión a membranas (Anderluhet et al., 1999).

La interacción con membranas y la actividad formadora de poros de StIE2C resultó similar a la de StIr. Sin embargo, se encontró que la presencia de agregados diméricos de StIE2C en solución estabilizados por enlace disulfuro incrementa de manera significativa la capacidad permeabilizante de la toxina y su actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos. Los dímeros de StIE2C preformados fueron capaces de interactuar con las membranas y potenciar la acción formadora de poros de StIr. Este hallazgo constituye una primera evidencia experimental que sugiere un papel relevante de oligómeros preformados en solución en el mecanismo de formación de poros de las actinoporinas. De manera que, StIE2C constituye una herramienta valiosa para el estudio del mecanismo de formación de poros de las actinoporinas (Valle et al., 2011).

APLICACIONES POTENCIALES DE LAS STICHOOLYSINAS EN LA BIOMEDICINA

El estudio de las potenciales aplicaciones de las sticholysinas en la biomedicina o en la nanobiotecnología demanda de un mayor conocimiento de los complejos procesos de formación de poros y un esclarecimiento de cada una de las etapas del mecanismo, el cual puede ser analizado desde la proteína o desde la membrana, o desde ambos. Aspectos que resultan además de interés son los relacionados con las diferencias de actividad funcional existentes entre de StI y StII y los requerimientos lipídicos para la interacción con las membranas y la consecuente formación de poros.

Entre las aplicaciones potenciales de las Sts en la biomedicina se encuentran la construcción de inmunotoxinas contra células indeseadas (Tejuca et al., 1999, 2004, 2009) y el diseño de sistemas para la liberación controlada de drogas y macromoléculas al citosol celular, como ha sido demostrado para ciertas porinas bacterianas (Provoda y Lee, 2000).

Las inmunotoxinas son moléculas quiméricas construidas mediante la unión química o genética de toxinas y moléculas que direccionan la actividad citotóxica hacia la eliminación selectiva de células no deseadas. Ejemplos de célula blanco lo constituyen las tumorales, células infectadas por virus, subpoblaciones de células normales y células parasitarias. Las toxinas más utilizadas en la construcción de inmunotoxinas han sido aquellas que actúan intracelularmente, afectando la síntesis proteica de la célula blanco, mientras que anticuerpos monoclonales (AcMs), interleuquinas, factores reguladores del crecimiento celular y hormonas han sido empleados como agentes direccionadores.

El empleo de toxinas que actúan sobre la membrana celular constituye una alternativa atractiva para el diseño de nuevas inmunotoxinas, debido a que su mecanismo de acción no requiere de internalización celular. Las actinoporinas pudieran resultar entidades moleculares interesantes para el logro de preparaciones inmunotóxicas altamente eficientes y específicas..

StI fue conjugada a ior C5, AcM que reconoce al Ag tumor asociado ior C2, presente en tumores de colon (Tejuca et al., 2004). El estudio de la capacidad de unión del conjugado obtenido usando la línea celular de cáncer de colon SW948 demostró que la molécula híbrida se une a la célula tumoral a través del AcM y no a través de la zona de unión de la citolisina. En correspondencia, el conjugado mostró mayor especificidad en su efecto tóxico frente a la línea celular de cáncer de colon, en comparación con la citolisina libre. Sin embargo no se logró con este conjugado eliminar la actividad inespecífica (Tejuca et al, 2004).

Con el objetivo de reducir la toxicidad no específica de los conjugados basados en PFP, se han diseñado y obtenido variantes inactivas de PFP, activables únicamente ante determinados estímulos biológicos asociados a los tumores. Una de las propiedades utilizadas por los investigadores para la activación específica de estos sistemas, es la sobreexpresión de proteinasas en el contexto tumoral. El mutante StI W111C con un residuo de cisteína en la región de unión a la membrana (Penton et al., 2011) ha sido empleado para la construcción de inmunotoxinas activables por proteinasas asociadas a tumores. La unión de un AcM a través de este residuo provocaría la inactivación temporal de la toxina y la activación ocurriría mediante el corte proteolítico de un péptido que uniría a ambas entidades a través de la cisteína 111. El uso de este mutante fue validado dado que su variante dimérica, estabilizada por un puente disulfuro, no exhibe capacidad de unión a las membranas biológicas y su actividad funcional se recupera en un medio reductor. Este resultado demuestra que es posible eliminar la actividad inespecífica de las inmunotoxinas basadas en actinoporinas, mediante la conjugación del AcM en la zona de unión de la toxina a la membrana (Tejuca et al, 2009). La construcción de inmunotoxinas activables por proteinasas asociadas a tumores a partir del mutante StI W111C se encuentra en fase de desarrollo. Una inmunotoxina basada sólo en la porción N-terminal de las actinoporinas unido a un elemento direccionalizador que posibilite un aumento de la actividad

citotóxica específica de esta secuencia hacia la célula blanco, constituyen otra alternativa con algunas ventajas adicionales, como es la factibilidad de producir inmunotoxinas recombinantes, la reducción de la inmunogenicidad, mayor homogeneidad y producción más económica (Tejuca et al., 2009).

La vehiculización de Sts, conjuntamente con un antígeno, en nanopartículas como los liposomas, pudiera constituir una alternativa para la direccionalización de esta molécula al citosol de las células presentadoras de antígenos (APC), de manera de favorecer una inmunidad mediada por células de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL). Los liposomas con su contenido serán preferencialmente fagocitados por las APC (macrófagos y dendríticas) y en las vesículas endosomales donde ellos experimentan un proceso de desestabilización (Gregoriadis, 1990, Rao y Alving, 2000), se favorecerá la liberación del antígeno y de St. Un proceso no muy bien estudiado y conocido como endosomolisis (Provoda y Lee, 2000) seguirá a este evento como resultado de la formación de poros de St, favoreciendo el acceso del antígeno al citosol celular. Si bien se ha informado ampliamente las propiedades inmunomoduladoras de las toxinas formadoras de poros de origen bacteriano para la inducción de una respuesta CTL específica a antígenos, empleando diferentes estrategias que incluye su vehiculización en liposomas (Dietrich et al., 2001), nada se ha referido a las toxinas funcionalmente homólogas y provenientes de organismos eucariontes marinos.

Atendiendo a la homología funcional de las sticholysinas con las PFP de origen bacteriano, era posible presuponer que ellas exhibieran capacidad para modular una respuesta inmune celular antígeno-específica de tipo CTL. En una primera etapa se diseñó una vesícula liposomal constituida por dipalmitoil PC (DPPC) y chol, donde las sticholysinas no exhibieron capacidad permeabilizante, por lo que fue posible su encapsulación con elevada eficiencia, junto a un antígeno modelo como la ovoalbúmina (OVA) (Lanio et al., 2010). In vivo, estas vesículas liposomales, que co-encapsulaban cualquiera de las variantes de sticholysinas y OVA, fueron ca-

paces de potenciar en ratones la respuesta CTL específica al antígeno, en comparación con las preparaciones liposomales que sólo contenían OVA. El mutante StI W111C en su forma de dímero reversiblemente inactivo, estabilizado por enlaces disulfuro, indujo también una potente respuesta inmune CTL contra OVA cuando se administró co-encapsulado con el antígeno. Sólo en un entorno reductor como el interior celular o endosomal se debe facilitar el tránsito de este mutante a la estructura monomérica activa, por lo que esta preparación vacunal, siendo más segura en términos de un menor efecto tóxico inespecífico, fue capaz de inducir una respuesta CTL similar a los liposomas que contenían StI/StII. De manera interesante, liposomas que contenían una variante del mutante StIW111C dimérico irreversiblemente inactivo, fueron capaces de inducir una respuesta inmune celular específica a OVA similar a las preparaciones vacunales que contiene cualquiera de las variantes de sticholysinas salvajes. Esto sugiere una dependencia no absoluta del efecto inmunomodulador de las sticholysinas y su capacidad de formar poros en las membranas. La funcionalidad de la respuesta CTL potenciada por la preparación liposoma y sticholysinase evidenció en un ensayo antitumoral, en un escenario preventivo, donde se observó un incremento del porcentaje de animales sin tumor y de la sobrevida en ratones inmunizados con esta preparación vacunal y retados con células tumorales que expresan OVA. Estas propiedades inmunomoduladoras de las Sticholysinas encapsulada en liposomas, probablemente se asocien con su estructura molecular particular y propiedades membranotrópicas. En estos momentos se profundiza en las características de la respuesta inmune inducida por la combinación liposomas y sticholysinas y en sus aspectos mecánicos.

REFERENCIAS

- Alegre-Cebollada J., Cunietti M., Herrero-Galán E., Gavilanes J.G., Martínez del Pozo A. (2008) Calorimetric Scrutiny of Lipid Binding by Sticholysin II Toxin Mutants. *J. Mol. Biol.* 382: 920-930.
- Alegre-Cebollada J., Lacadena V., Onaderra M., Mancheño J.M., Gavilanes J.G., Del Pozo A.M. (2004) Phenotypic selection and characterization of randomly produced non-haemolytic mutants of the toxic sea anemone protein sticholysin II. *FEBS Lett.* 575: 14-18.
- Alvarez C., Casallanovo F., Shida C.S., Nogueira L.V., Martinez D., Tejuca M., Pazos I.F., Lanio M.E., Menestrina G., Lissi E., Schreier S. (2003). Binding of sea anemone pore-forming toxins Sticholysins I and II to interfaces. Modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem. Phys. Lipids* 122, 97-105.
- Alvarez-Valcarcel C.A., Dalla Serra M., Potrich C., Bernhart I., Tejuca M., Martinez D., Pazos F., Lanio M.E., Menestrina G. (2001) Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J.* 80(6):2761-74.
- Alvarez C., Mancheño J.M., Martínez D., Tejuca M., Pazos F., Lanio M.E. (2009) Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *A Review Toxicon* 54: 1135-1147.
- Anderluh G., Barlič A., Podlesek Z., Podlesek K., Maček P., Pungercar J., Gubensek F., Zecchini M.L., Dalla-Serra M., Menestrina G. (1999) Cysteine-scanning mutagenesis of a eukariotic pore-forming toxin from sea anemone. *Eur. J. Biochem.* 263: 128-136.
- Anderluh G. y Maček P. (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40, 111-124.
- Anderluh G. y Maček P. (2003) Dissecting the Actinoporin Pore-Forming Mechanism. *Structure*. vol 11: 1312-1313.

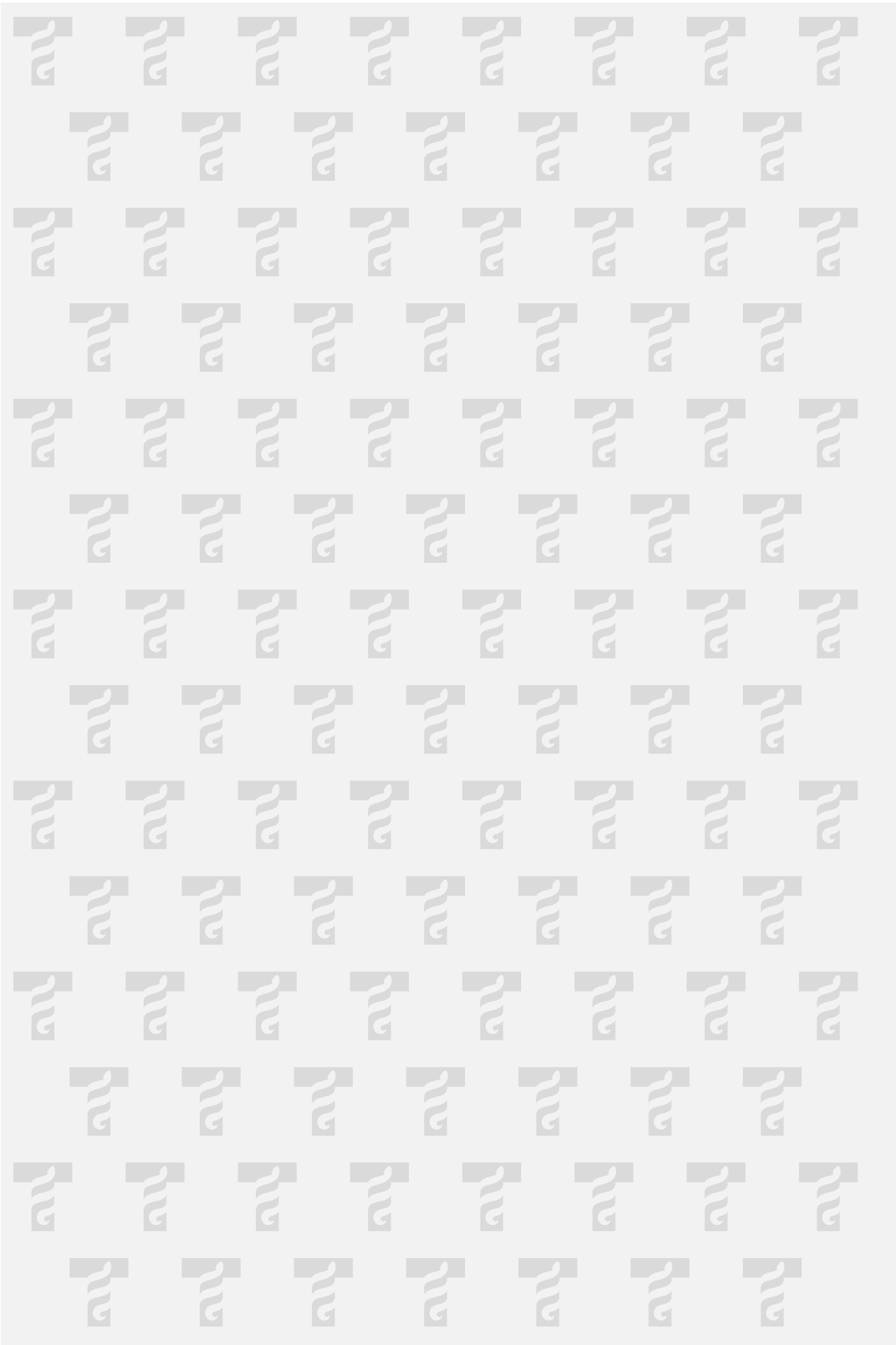
- Anderluh G., Razpotnik A., Podlesek Z., Maček P., Sparovic F., Norton R.S. (2005) Interaction of the Eukaryotic Pore-forming Cytolysin Equinatoxin II with Model Membranes: 19F NMR Studies. *J. Mol. Biol.* 347: 27-39.
- Athanasiadis A., Anderluh G., Maček P., Turk D. (2001) Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure*. 9: 341-346.
- Barlic, A., Gutierrez-Aguirre, I., Caaveiro, J.M., Cruz, A., Ruiz-Arguello, M.B., Perez-Gil, J., Gonzalez-Mañas, J.M. (2004) Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *J. Biol. Chem.* 279, 34209–34216.
- Creighton T.E. (1988) Disulphide Bonds and Protein Stability. *BioEssay*. 8(2): 57-63.
- Dietrich G., Hess J., Gentschev I., Knapp B., Kaufmann S. H., Goebel, W. (2001) From evil to good: a cytolysin in vaccine development. *Trends Microbiol.* 9: 23-8.
- Gregoriadis G. (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* 11: 89-97.
- Gutiérrez-Aguirre I., Barlič A., Podlesek Z., Maček P., Anderluh G., González-Mañas, J. M. (2004). Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochem. J.* 384: 421-428.
- Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlic A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Macek P., Turk D., Gonzalez-Mañas J. M., Lakey J. H., Anderluh G. (2002) Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J. Biol. Chem.* 277, 41916-41924.
- Huerta V., Morera V., Guanche Y., China G., González L. J., Betancourt L., Martínez D., Alvarez C., Lanio M. E. y Besada V. (2001) Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon*. 39: 1253-1256.

- Kem W.R. (1988) Sea anemone Toxins: structure and action. En: The biology of the nematocyst. New York. Academic Press. p. 375-405.
- Kristan K., Podlesek Z., Hojnik V., Gutiérrez-Aguirre I., Gunčar G., Turk D., González-Mañas J., Lakey J.H., Maček P., Anderluh, G. (2004) Pore formation by Equinatoxin, a Eukaryotic Pore-forming Toxin, Requires a Flexible N-terminal Region and a Stable β -Sandwich. J. Biol. Chem. 45. vol 279: 46509-46517.
- Kristan K.C., Viero G., Dalla Serra M., Maček P., Anderluh G. (2009) Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. Toxicon. 54(8): 1125-1134.
- Lanio M.E., Lombardero J., Fernández L., Laborde R., Cruz Y., Luzardo M.C., Mesa C., Álvarez C., Pazos F., Tejuca M., Valle A., Alonso M.E., Canet L. (2010) Composiciones vacunales a base de Sticholysina encapsulada en liposomas, Patente CU-2010-144.
- Lanio M. E., Morera V., Alvarez C., Tejuca M., Gomez T., Pazos F., Besada V., Martinez D., Huerta V., Padron G., Chavez M.A. (2001) Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. Toxicon 39 (2-3): 187-194.
- Leserman L. (2004) Liposomes as Protein Carriers in Immunology. Journal of Liposome Research 14: 175-189.
- López A., Valle A., Pedrera L., Martínez D., Fando R., Schreier S., Álvarez C., Lanio M.E., Pazos F. (2011) The Sticholysin I mutants StI E2C and StI R52C show similar binding to liposomal vesicles but differ in their permeabilizing activity. Biotecnología Aplicada. 28(1):13-18
- Macek P., Zecchini M., Stanek K., Menestrina G. (1997) Effect of membrane-partitioned n-alcohols and fatty acids on pore-forming activity of a sea anemone toxin. Eur. Biophys. J. 25, 155-162
- Macek P., Belmonte G., Pederzoli C., Menestrina G. (1994) Mechanism of action of equinatoxin II, a cytotoxin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. Toxicology 87, 205-227

- Mancheño J.M., Martin-Benito J., Martínez-Ripoll M., Gavilanes, J.G., Hermoso, J.A. (2003) Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insight into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*. 11: 1319-1328.
- Malovrh P., Viero G., Dalla Serra M., Podlessek Z., Lakey J.H., Macek P., Menestrina G., Anderluh G. (2003) A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J. Biol. Chem.* 278, 22678-2268.
- Martinez D, Campos AM, Pazos F, Alvarez C, Lanio ME, Casallanovo F, Schreier S, Salinas RK, Vergara C, Lissi E. (2001) Properties of StI and StII, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. *Toxicon* 39(10):1547-60.
- Martínez D., Otero A., Álvarez C., Pazos F., Tejuca M., Lanio M.E., Gutiérrez-Aguirre I., Barlič A., Iloro I., Arrondo J.L., González-Mañas J.M., Lissi E. (2007) Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of StII with lipidic interfaces. *Toxicon*. 49(1): 68-81.
- Menestrina G, Cabiaux V, Tejuca M. (1999) Secondary structure of sea anemone cytolytins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*. 254(1):174-80.
- Pazos F., Valle A., Martínez D., Ramírez A., Calderón L., Pupo A., Tejuca M., Morera V., Campos J., Fando R., Dyszy F., Schreier S, Horjales E., Álvarez C., Lanio M.E., Lissi, E. (2006) Structural and functional characterization of a recombinant sticholysin I (rStI) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 12: 1083-1094.
- Pentón D., Pérez-Barzaga V., Díaz I., Reytor M., Campos J., Fando R., Calvo L., Cilli E.M., Morera V., Castellanos-Serra L., Pazos F., Lanio M.E., Álvarez C., Pons T., Tejuca M. (2011) Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein Eng. Des. Sel.* 24(6): 485-493.

- Poklar N., Fritz J., Macek P., Vesnaver G., Chalikian T.V. (1999) Interaction of the pore-forming protein equinotoxin II with model lipid membranes: a calorimetric and spectroscopic study. *Biochemistry* 38, 14999–15008.
- Provoda C.J., Lee K.D. (2000) Bacterial pore-forming hemolysis and their use in the cytosolic delivery of macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* 41: 209-221.
- Rao M., Alving C.R. (2000) Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 41:171-88.
- Tejuca M., Anderluh G., Dallaserra M. (2009) Sea anemone cytolytic toxins as toxic components of immunotoxins (2009). *Toxicon* 54(8):1206-14.
- Tejuca M., Anderluh G., Macek P., Marcet R., Torres D., Sarracent J., Alvarez C., Lanio M.E., Dalla Serra M., Menestrina G. (1999) Antiparasite activity of sea-anemone cytolytic toxins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-*Giardia* antibodies. *Int J Parasitol.* 29(3):489-98.
- Tejuca M., Dalla Serra M., Ferreras M., Lanio M.E., Menestrina G. (1996) Mechanism of membrane permeabilization by Sticholysin I, a cytolytic toxin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35: 14947-14957.
- Tejuca M., Dalla Serra M., Potrich C., Alvarez C., Menestrina G. (2001) Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J Membr Biol.* 183(2):125-35.
- Tejuca M., Diaz I., Figueredo R., Roque L., Pazos F., Martinez D., Iznaga-Escobar N., Perez R., Alvarez C., Lanio M.E. (2004) Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *Int Immunopharmacol.* 4(6):731-44.
- Valle A., López-Castilla A., Pedrera L., Martínez D., Tejuca M., Campos J., Fando R., Lissi E., Álvarez C., Lanio M.E., Pazos F., Schreier S. (2011) Cys mutants in functional regions of Sticholysin I clarify the participation of these residues in pore formation. *Toxicon.* 58: 8-17.

- Watson D. S, Endsley A N, Huang L. (2012) Design considerations for liposomal vaccine: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune response to liposome associated antigens. Vaccine, 30:2256-2272 .



DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO EN EL INSTITUTO CLODOMIRO PICADO

Guillermo León*, Álvaro Segura, María Herrera, Mariángela Vargas, Mauren Villalta, Aarón Gómez, Ricardo Estrada

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

*Corresponding author: Guillermo León, Instituto Clodomiro Picado,
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa
Rica. Phone: 506-22293135. Fax: 506-22920485.

e- mail: guillermo.leon@ucr.ac.cr

RESUMEN

El Instituto Clodomiro Picado (ICP) es un instituto de investigación adscrito a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, el cual se dedica al estudio de los venenos de serpiente; y al desarrollo y producción de los antivenenos que se consumen en Centroamérica y en otras regiones afectadas por el problema del ofidismo. En el ICP se emplean caballos como fuente de inmunoglobulinas y los antivenenos son formulados con moléculas de inmunoglobulinas completas, que son purificadas por precipitación con ácido caprílico y son formuladas como solución inyectable o como polvo liofilizado. El presente resumen sintetiza los conceptos básicos que sustentan el diseño del proceso de producción del ICP.

PALABRAS CLAVE: Veneno de serpiente; antiveneno; ácido caprílico; IgG.

ABSTRACT

Instituto Clodomiro Picado (ICP) is a research institute attached to the Microbiology Faculty of the Universidad de Costa Rica, dedicated to the study of snake venoms; and to the development and production of the antivenoms con-

sumed in Central America and other regions affected by ophidism. In the ICP, horses are used as immunoglobulin source and antivenoms are formulated using whole immunoglobulin molecules, purified by caprylic acid precipitation and formulated as solutions for injection or as lyophilized powder. This overview summarizes the basic concepts underlying the design of the production process of the ICP.

KEY WORDS: Snake venom; antivenom; caprylic acid; IgG.

INTRODUCCIÓN

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud importante en muchos lugares del mundo (Kasturiratne et al., 2008), particularmente en los países tropicales, donde las condiciones climáticas (temperatura y humedad relativa cercana a los 30°C y 70%, respectivamente) favorecen la proliferación de serpientes; y las condiciones económicas limitan la accesibilidad a antivenenos de calidad y el establecimiento de cadenas de frío para el almacenamiento y distribución de este tipo de medicamentos (Gutiérrez et al., 2009).

Por otra parte, la poca rentabilidad económica de la comercialización de antivenenos, hace que pocos laboratorios productores asuman el suministro de las zonas más vulnerables en América Latina, Asia y África. El desabastecimiento producido por la falta de oferta de antivenenos, ha favorecido el surgimiento de un mercado inescrupuloso de productos con calidad deficiente, o que del todo no son eficaces para el tratamiento de los envenenamientos que ocurren en una región particular.

Los antivenenos ofídicos son soluciones de inmunoglobulinas que tienen la capacidad de neutralizar los efectos tóxicos inducidos por los diferentes componentes de los venenos de serpiente. El procedimiento general empleado para la producción industrial de antivenenos no ha cambiado sustancialmente desde las primeras formulaciones comerciales producidas a principios del siglo XX. Sin embargo, la incorporación constante de nuevo conocimiento científico ha permitido la mejora de la eficiencia de los procesos de

producción, y de la eficacia, efectividad y seguridad de las formulaciones actuales.

El presente resumen sintetiza los conceptos básicos que sustentan el diseño del proceso de producción de antivenenos del Instituto Clodomiro Picado (ICP), incluyendo la manutención de la colección de serpientes dedicada a la producción de veneno, la inmunización de animales para la producción de anticuerpos anti-veneno (León et al., 2011) y la purificación de esos anticuerpos para su posterior formulación como solución inyectable (Gutiérrez et al., 2011).

MANUTENCIÓN DE SERPIENTES Y PRODUCCIÓN DE VENENO.

La manutención en cautiverio de una colección de serpientes venenosas, es la forma más común para establecer una fuente permanente del veneno que se consume en los esquemas de inmunización y en los ensayos de control de calidad requeridos para la elaboración de antivenenos. El número de ejemplares que deben conformar la colección se determina considerando la productividad de veneno por individuo y el consumo proyectado. Por ejemplo, para la producción del antiveneno anti-coral que se consume en Centroamérica, es necesario emplear cerca de 300 mg de veneno de la serpiente *Micrurus nigrocinctus*. Considerando que cada serpiente de esta especie produce cerca de 15 mg de veneno al año, puede calcularse que la colección de corales debe estar conformada por al menos 20 ejemplares.

En el caso del ICP, la colección de corales está conformada por 80 serpientes. Para la manutención de estos ejemplares se emplea una dieta basada en sus presas naturales (serpientes de los géneros *Geophis* y *Ninia*), complementada con una dieta alternativa a base de pescado (Chacón et al., 2012). Los animales alimentados de esta manera han logrado ser mantenidos en cautiverio durante un tiempo que en promedio supera los dos años.

PRODUCCIÓN DE PLASMA HIPERINMUNE.

En el mundo, la mayor parte de los laboratorios productores de antivenenos emplean caballos como fuente de inmuno-

globulinas. Sin embargo, también existen formulaciones comerciales preparadas con anticuerpos ovinos. También, antivenenos experimentales han sido preparados con anticuerpos de otras especies como cabras, camellos, llamas, burros y gallinas (Gutiérrez et al., 2011; León et al., 2011).

La mayor parte de la capacidad neutralizante de los antivenenos preparados en caballos es debida a anticuerpos de las clases IgG3 e IgG5, anteriormente conocida como IgG(T) (Fernandes et al., 1991). Debido a que estas inmunoglobulinas son altamente glicosiladas, ha sido sugerido que su inmunogenicidad debe ser mayor que la de inmunoglobulinas de otras especies, como por ejemplo las de oveja (Sjostrom et al., 1994). Sin embargo, un estudio reciente mostró diferencias mínimas en la incidencia de reacciones adversas inducidas por antivenenos de origen equino y de origen ovino (Abubakar et al., 2010).

Por otra parte, las inmunoglobulinas de camélidos también han sido empleadas para la formulación de antivenenos ofídicos (Fernández et al., 2010). Estos antivenenos presentan dos tipos de anticuerpos: 1- Anticuerpos heterotetraméricos (~160kDa) conformados por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas, y 2- Anticuerpos homodiméricos (~100 kDa), conocidos también como anticuerpos de cadena pesada, los cuales corresponden a las subclases IgG2 e IgG3 y están compuestos únicamente por dos cadenas pesadas idénticas.

Anticuerpos antiveneno de la clase IgY (~180kDa) pueden ser purificados a partir de la yema de los huevos de gallina. Algunos investigadores han sugerido que la producción de antivenenos formulados con IgY podría resultar más económica que la producción de antivenenos de origen equino (de Almeida et al., 2008). Esta hipótesis está siendo evaluada en el ICP mediante el estudio de la composición del veneno de la serpiente Taipán (*Oxyuranus scutellatus*) de Papúa Nueva Guinea (Herrera et al., 2012) y la comparación de su inmunogenicidad en caballos (Vargas et al., 2011) y en gallinas.

Una vez seleccionada la especie empleada como fuente de inmunoglobulinas, debe diseñarse un esquema de inmunización. Es decir, una serie de inyecciones de veneno (o venenos) cuya dosis, vía de administración y frecuencia de aplicación son definidas con el fin de estimular la producción de anticuerpos. El uso de adyuvantes inmunológicos contribuye a mejorar el efecto inmunoestimulador del veneno y a incrementar la capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos (León et al., 2011).

Hasta ahora, las emulsiones simples agua/aceite (como el adyuvante de Freund) han sido las más eficaces en incrementar las respuestas por anticuerpos contra veneno de serpiente. Sin embargo, la severidad de las lesiones que producen en el sitio donde se inyectan, limita su uso a las primeras etapas de los esquemas de inmunización. Por eso, los refuerzos subsecuentes son administrados empleando otros adyuvantes como las sales minerales (León et al., 2011).

La inmunización de animales puede ser realizada empleando como antígeno uno o varios venenos, para producir antivenenos monoespecíficos o poliespecíficos, respectivamente. A su vez, los antivenenos poliespecíficos pueden ser producidos mediante dos estrategias: a) inmunizando con una mezcla de venenos, o b) mezclando antivenenos monoespecíficos. La selección de la estrategia empleada en la producción de antivenenos poliespecíficos debe considerar que algunos venenos poseen actividad inmunosupresora, y por eso deben realizarse experimentos para determinar los efectos cruzados en las respuestas por anticuerpos contra los venenos empleados como coinmunógenos (dos Santos et al., 2011).

La constitución genética de los individuos inmunizados es otro factor que determina la capacidad neutralizante de los plasmas obtenidos. Estas diferencias individuales se hicieron evidentes en un estudio en el que, de un grupo de animales inmunizados de la misma manera con los venenos de las serpientes *Protobothrops mucrosquamatus* y *Viridovipera stejnegeri*, solo algunos alcanzaron capacidades neutralizantes superiores a las especificaciones establecidas para la producción de antivenenos (Villalta et al., 2012)

SELECCIÓN DE LA MOLÉCULA EMPLEADA COMO PRINCIPIO ACTIVO.

Durante décadas ha sido considerado que los antivenenos formulados empleando fragmentos $F(ab')_2$ como sustancia activa son más seguros y eficaces que los que emplean inmunoglobulinas completas (IgG). Por eso en la actualidad, la mayoría de los laboratorios productores de antivenenos formulan sus productos empleando fragmentos $F(ab')_2$.

La presunción de la mayor seguridad de los antivenenos formulados con fragmentos $F(ab')_2$ se fundamenta en la consideración de que la mayoría de las reacciones tempranas inducidas por antivenenos, son producidas por anafilotoxinas liberadas como consecuencia de la activación de la vía clásica del complemento. Entonces se ha considerado que por no poseer el fragmento F_c , los fragmentos $F(ab')_2$ son incapaces de activar la vía clásica del complemento y por lo tanto se ha asumido que estos antivenenos deben inducir reacciones adversas tempranas con una incidencia menor que los que usan IgG. Sin embargo, un estudio clínico reciente demuestra que antivenenos formulados con IgG ó con $F(ab')_2$ no difieren en la incidencia de las reacciones adversas que inducen (Otero et al., 2012).

Por otra parte, en comparación con las IgG's, los fragmentos $F(ab')_2$ poseen mayor volumen y velocidad de distribución. Esto es debido a las diferencias entre las masas de ambas moléculas. Con base en esas diferencias farmacocínticas, se ha asumido que los antivenenos formulados con fragmentos $F(ab')_2$ deben ser más eficaces que los formulados con IgG. Sin embargo, la evidencia clínica señala que los antivenenos formulados con IgG o con $F(ab')_2$ no difieren en su eficacia (Otero et al., 2012). Es posible que este resultado se deba a que las alteraciones de permeabilidad en la microvasculatura de la localidad donde el veneno es inyectado, hacen que la pared capilar no presente selectividad en la extravasación de moléculas de IgG o de fragmentos $F(ab')_2$ (Gutiérrez et al., 2003).

Por otro lado, tanto antivenenos formulados con IgG o con $F(ab')_2$ han mostrado ser muy eficaces para neutralizar la letalidad y los principales efectos sistémicos producidos por

los venenos de serpiente, pero poco eficaces en el control de los efectos locales (Gutiérrez et al., 2011). La pobre neutralización de los efectos locales puede atribuirse a la rapidez con la que estos efectos se desarrollan y a la falta de correlación entre las propiedades toxicocinéticas de los venenos y la farmacocinética de los antivenenos (Gutiérrez et al., 2003).

PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS Y FORMULACIÓN DE ANTIVENENOS.

Desde las primeras formulaciones que consistían en preparaciones crudas de inmunoglobulinas, los procedimientos de elaboración de antivenenos han adaptado diferentes técnicas físico-químicas para separar las inmunoglobulinas de los contaminantes proteicos propios del plasma. En general, esas técnicas se basan en la diferencia de solubilidad de las proteínas y se ven influenciadas por factores como la concentración de proteína, el pH y la fuerza iónica (Gutiérrez et al., 2011).

La precipitación con sales como el sulfato de amonio es una técnica de purificación de inmunoglobulinas ampliamente difundida entre los productores de antivenenos en el mundo. Otra técnica de purificación de inmunoglobulinas es la precipitación con ácido caprílico, la cual fue empleada para la producción industrial de los antivenenos que se consumen en Centroamérica (Rojas et al., 1994) y adaptada por el ICP para la producción de antivenenos para Nigeria (Gutiérrez et al., 2005), Papúa Nueva Guinea (Vargas et al., 2011) y Taiwán (Villalta et al., 2012). Actualmente, el ICP trabaja en la producción de antivenenos, empleando una técnica descrita para la purificación de inmunoglobulinas humanas en un sistema de dos fases acuosas polímero sal (Vargas et al., 2012).

Considerando que la sustancia activa de los antivenenos es únicamente las inmunoglobulinas que logran la neutralización de los componentes tóxicos del veneno, podemos señalar a las inmunoglobulinas no neutralizantes como los principales contaminantes en las formulaciones actuales. Por eso, los esfuerzos para mejorar la pureza de los antivenenos

nos deben dirigirse no solo a la separación físico-química de las inmunoglobulinas, sino que además a la implementación de estrategias de inmunización que permitan obtener plasmas con mayores títulos de anticuerpos neutralizantes (Segura et al., 2012).

Debido a que existen virus como el Hendra y el virus del oeste del Nilo, que pueden ser transmitidos desde los caballos empleados como fuente de inmunoglobulinas hasta los pacientes envenenados, es importante que la estrategia de purificación de inmunoglobulinas en la producción de antivenenos, incluya pasos específicos diseñados con el objetivo de remover o inactivar virus (Burnouf et al., 2004). En el ICP se está estudiando la seguridad viral conferida por procedimientos como la precipitación con ácido caprílico (Burnouf et al., 2007), el tratamiento con ‘solventes-detergentes’ (Segura et al., 2009a) y la formulación a pH ácido (Solano et al., 2012).

Una vez purificadas las inmunoglobulinas y formulado el antiveneno, la eficacia del producto debe garantizarse durante toda su vida útil. Por eso, es importante considerar que cuando el antiveneno va a ser empleado en lugares en los que no se puede garantizar la cadena de frío, la formulación debe incluir el uso de una estrategia de estabilización adecuada como la liofilización o la adición de co-solutos como el sorbitol (Segura et al., 2009b).

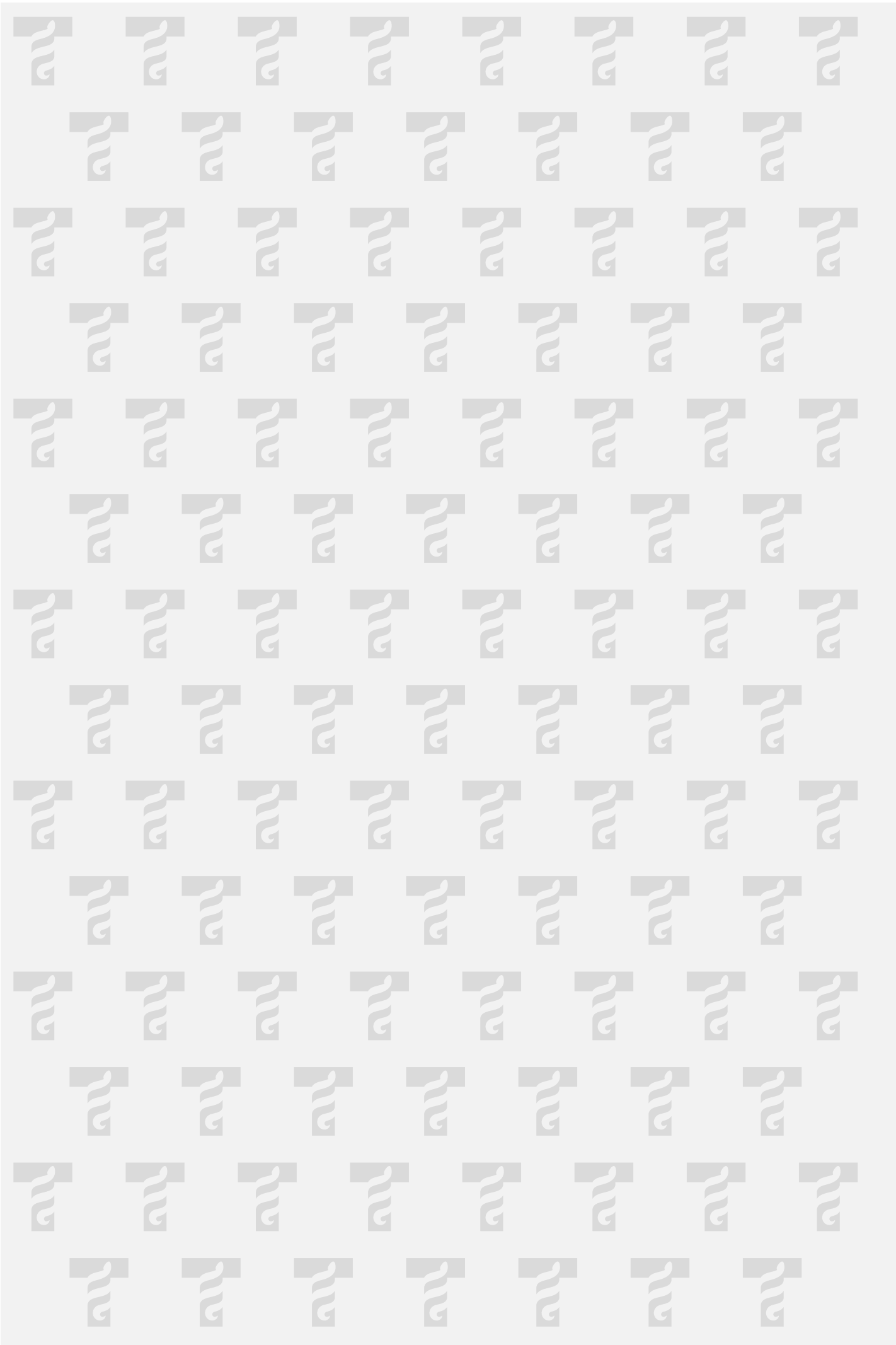
BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar, I.S., Abubakar, S.B., Habib, A.G., Nasidi, A., Durfa, N., Yusuf, P.O., Larnyang, S., Garnvwa, J., Sokomba, E., Salako, L., Theakston, R.D., Juszczak, E., Alder, N., Warrell, D.A., Nigeria-UK EchiTab Study Group., 2010. Randomised controlled double-blind non-inferiority trial of two antivenoms for saw-scaled or carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming in Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(7):e767.
- Burnouf, T., Griffiths, E., Padilla, A., Seddik, S., Stephano, M.A., Gutiérrez, J.M., 2004. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals.* 32, 115-128.

- Burnouf, T., Terpstra, F., Habib, G., Seddik, S. 2007. Assessment of viral inactivation during pH 3.3 pepsin digestion and caprylic acid treatment of antivenoms. *Biologicals* 35, 329-334.
- Chacón, D., Rodríguez, S., Arias, J., Solano, G., Bonilla, F., Gómez, A., 2012. Maintaining coral snakes (*Micrurus nigrocinctus*, Serpentes: Elapidae) for venom production on an alternative fish-based diet. *Toxicon* 60, 249-253.
- de Almeida, C.M., da Silva, C.L., Couto, H.P., Escocard, R.C., da Rocha, D.G., Sentinelli, L.P., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., 2008. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon* 52, 293-301.
- dos-Santos, M.C., Arroyo, C., Solano, S., Herrera, M., Villalta, M., Segura, A., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., León, G., 2011. Comparison of the effect of *Crotalus simus* and *Crotalus durissus ruruima* venoms on the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom: implications for the production of poly-specific snake antivenoms. *Toxicon* 57, 237-343.
- Fernandes, I., Takehara, H.A., Mota, I., 1991. Isolation of IgGT from hyperimmune horse anti-snake venom serum: its protective ability. *Toxicon* 29, 1373-1379.
- Fernández, G. P., Segura, A., Herrera, M., Velasco, W., Solano, G., Gutiérrez, J.M., León, G., 2010. Neutralization of *Bothrops matogrossensis* snake venom from Bolivia: Experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. *Toxicon* 55, 642-645.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B. 2003. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet.* 42, 721-741.
- Gutiérrez, J.M., Rojas, E., Quesada, L., León, G., Núñez, J., Laing, G.D., Sasa, M., Renjifo, J.M., Nasidi, A., Warrell, D.A., Theakston, R.D., Rojas, G., 2005. Pan-African polyspecific anti-venom produced by caprylic acid purification of horse IgG: an alternative to the antivenom crisis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 99, 468-475.
- Gutiérrez, J.M., Fan, H.W., Silvera, C.L., Angulo, Y., 2009. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon* 53, 625-630.

- Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B. and Angulo, Y., 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 10, 369-380.
- Herrera, M., Fernández, J., Vargas, M., Villalta, M., Segura, Á., León, G., Angulo, Y., Paiva, O., Matainaho, T., Jensen, S.D., Winkel, K.D., Calvete, J.J., Williams, D.J., Gutiérrez, J.M., 2012. Comparative proteomic analysis of the venom of the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia: role of neurotoxic and procoagulant effects in venom toxicity. *J Proteomics* 75, 2128-2140.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med* 5:e218.
- León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R. and Gutiérrez, J.M., 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 10, 381-398.
- Otero-Patiño, R., Segura, A., Herrera, M., Angulo, Y., León, G., Gutiérrez, J.M., Barona, J., Núñez, V., Estrada, S., Pereañez, A., Quintana, J.C., Vargas, L.J., Gómez, J.P., Díaz, A., Suárez, A.M., Fernández, J., Ramírez, P., Fabra, P., Perea, M., Fernández, D., Arroyo, Y., Betancur, D., Pupo, L., Córdoba, E.A., Ramírez, C.E., Arrieta, A.B., Rivero, A., Mosquera, D.C., Conrado, N.L., Ortiz, R., 2012. Comparative study on the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated IgG and F(ab')₂ antivenoms, in *Bothrops asper* bites in Colombia. *Toxicon* 59, 344-355.
- Rojas, G., Jiménez, J.M., Gutiérrez, J.M., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351-363.
- Segura, A., Herrera, M., González, E., Vargas, M., Solano, G., Gutiérrez, J.M., León, G., 2009a. Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: Towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon* 53, 609-615.

- Segura, A., León, G., Su, C.Y., Gutiérrez, J.M., Burnouf, T. 2009b. Assessment of the impact of solvent/detergent treatment on the quality and potency of a whole IgG equine antivenom. *Biologicals* 37, 306-312.
- Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2012. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals*. En prensa.
- Sjostrom, L., AL-Abdulla, I.H., Rawat, S., Smith, D.C., Landon, J., 1994. A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon* 32, 427-433.
- Solano, S., Segura, Á., León, G., Gutiérrez, J.M., Burnouf, T. 2012. Low pH formulation of whole IgG antivenom: impact on quality, safety, neutralizing potency and viral inactivation. *Biologicals* 40, 129-133.
- Vargas, M., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Estrada, R., Cerdas, M., Paiva, O., Matainaho, T., Jensen, S.D., Winkel, K.D., León, G., Gutiérrez, J.M., Williams, D.J., 2011. Preclinical evaluation of caprylic acid-fractionated IgG antivenom for the treatment of Taipan (*Oxyuranus scutellatus*) envenoming in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(5):e1144.
- Vargas, M., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., León, G., Burnouf, T., 2012. Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two phase system fractionation. *Biotechnol Prog* 28, 1005-1011.
- Villalta, M., Pla, Davinia, Yang, S.L., Sanz, L., Segura, A., Vargas, M., Chen, P.Y., Herrera, M., Estrada, R., Cheng, Y.F., Lee, Ch.D., Cerdas, M., Jiang, J.R., Angulo, Y., León, G., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., 2012. Snake venomomics and antivenomics of *Protobothrops mucrosquamatus* and *Viridovipera stejnegeri* from Taiwan: keys to understand the variable immune response in horses. *J Proteomics*. 75, 5628-5645.



UTILIDAD DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÉPITOPOS EN TOXINAS

Bruno Lomonte

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica
e-mail: bruno.lomonte@ucr.ac.cr

RESUMEN

Los péptidos sintéticos han ganado un lugar relevante dentro de la “caja de herramientas” de la investigación biomédica actual. Las técnicas de síntesis automatizada y el costo decreciente de los procesos, unidas a mejoras en su eficiencia y velocidad, hacen cada vez más accesibles a estas herramientas. Su aplicabilidad es muy amplia, desde la generación de moléculas farmacológicamente activas, hasta el desarrollo de vacunas, por ejemplo. En este resumen se presentan algunos ejemplos de las aplicaciones de péptidos sintéticos en el estudio de las fosfolipasas A₂ miotóxicas, un grupo de proteínas responsables de la necrosis del tejido muscular que ocurre frecuentemente en los envenenamientos causados por serpientes de la familia Viperidae

INTRODUCCIÓN

Vincent Duvigneaud y colaboradores lograron sintetizar, en 1953, una pequeña hormona peptídica: el nonapéptido oxitocina. Tras un arduo trabajo de muchos meses con un equipo de expertos en síntesis orgánica, este avance fue reconocido en 1955 con el Premio Nobel de Química. En comparación, gracias a los avances que siguieron en las estrategias de síntesis de péptidos, esta meta ya se podía lograr en apenas unas horas de trabajo para la década de 1990. Como bien escribía el visionario novelista Jules Verne (1828-1905),

“...aquello que hoy puede catalogarse de fantástico, será lo cotidiano del mañana... es solo una cuestión de tiempo”.

Bruce Merrifield, otro galardonado con el Nobel de Química (1986), sentó las bases para la síntesis de péptidos moderna, al desarrollar métodos para efectuar las reacciones de acople secuencial de aminoácidos unidos a una fase sólida, junto con la introducción de diversas estrategias de protección de las cadenas laterales. La longitud de los péptidos sintetizados ha ido superando límites cada vez mayores, lográndose - por ejemplo - producir la fosfolipasa A2 humana (grupo IIA), de 124 aminoácidos, mediante la unión de dos segmentos sintéticos de 51 y 53 residuos (Hackeng et al., 1997).

El presente resumen presenta algunos ejemplos de las aplicaciones de péptidos sintéticos en el estudio de las fosfolipasas A2 miotóxicas, un grupo de proteínas responsables de la necrosis del tejido muscular que ocurre frecuentemente en los envenenamientos causados por serpientes de la familia Viperidae (Gutiérrez y Lomonte, 1995; Montecucco et al., 2008; Lomonte y Gutiérrez, 2011).

UTILIDAD DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Los péptidos sintéticos constituyen en la actualidad una herramienta muy útil en la investigación biomédica, con aplicabilidad en (a) la construcción de moléculas farmacológicamente activas, (b) el estudio de las relaciones estructura-función de proteínas, (c) la generación de anticuerpos contra sitios predeterminados de un antígeno proteico, (d) la identificación de epitopos lineales para linfocitos B y T en proteínas, (e) el desarrollo de vacunas, o (f) el refinamiento de pruebas de utilidad diagnóstica, entre muchos otros fines. En ciertos casos, la bioactividad de una proteína logra ser reproducida mediante un pequeño segmento, el cual puede ser sintetizado con relativa facilidad y eficiencia, a un costo cada vez más accesible.

PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN EL ESTUDIO

DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE MIOTOXINAS

En un ejemplo de nuestra propia experiencia, las actividades biológicas de una familia de miotoxinas presente en los venenos de muchas especies de serpientes de la familia Viperidae, denominadas “fosfolipasas A2 tipo Lys49”, pueden ser reproducidos por un segmento de apenas 13 aminoácidos, ubicados cerca de su extremo carboxilo-terminal (secuencia 115-129, en la nomenclatura convencional de Renetseder et al. [1985]). Estos péptidos C-terminales de las miotoxinas Lys49 son capaces de inducir citotoxicidad y actividad bactericida in vitro, así como mionecrosis y edema en animales de experimentación (Lomonte et al., 1994, 2003a, 2003b; Calderón y Lomonte, 1998; Páramo et al., 1998; Núñez et al., 2001; Angulo y Lomonte, 2005; Lomonte y Rangel, 2012). Lo anterior ha servido de base para proponer que el mecanismo de toxicidad de estas proteínas, que poseen estructura de fosfolipasa A2, pero que carecen de actividad catalítica, se basa en la existencia de un sitio bioactivo que comprende los aminoácidos 115-129 (Figura 1), el cual es capaz de interactuar con membranas y desestabilizarlas (Lomonte et al., 1994; Lomonte y Rangel, 2012).

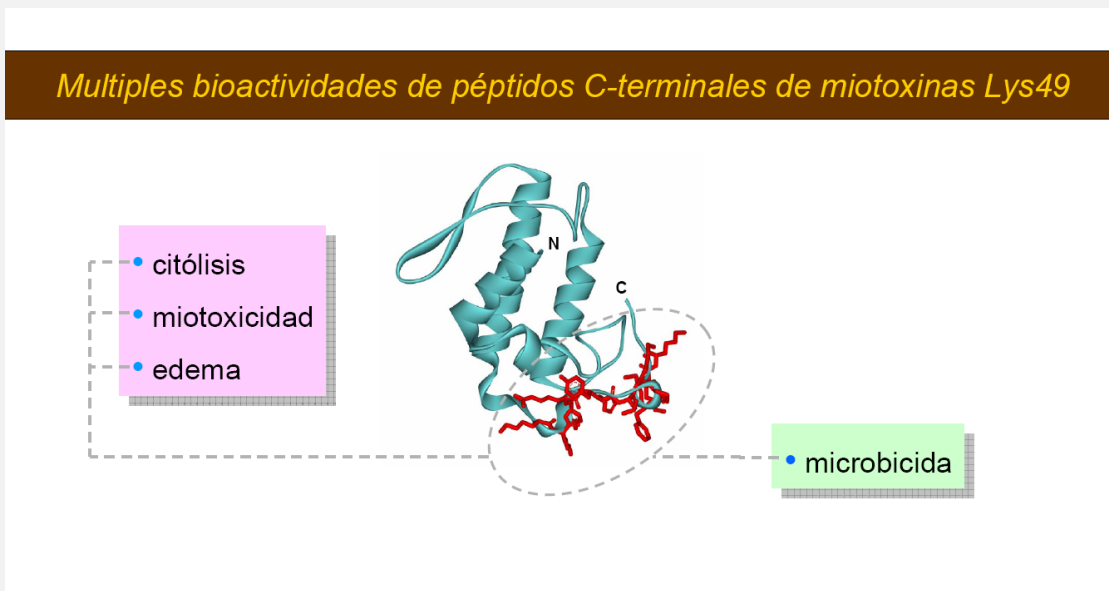


Figura 1: Las diversas actividades biológicas de muchas miotoxinas tipo Lys49 (variantes catalíticamente inactivas de fosfolipasa A2) pueden ser reproducidas empleando un segmento (115-129) de su región C-terminal (señalado en rojo), en la forma de péptido sintético.

A través del uso de péptidos sintéticos, también se ha podido ubicar el sitio de las miotoxinas tipo-Lys49 que media su fuerte interacción con el receptor 2 para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF-R2), con una constante de disociación (K_d) en el orden de los 5×10^{-9} M (Yamazaki et al., 2005; Fujisawa et al., 2008). Al igual que las bioactividades anteriormente mencionadas, la unión a este receptor celular depende del segmento C-terminal 115-129 (Figura 2), cuyo péptido sintético interactúa con una afinidad nanomolar en ensayos de unión realizados mediante análisis de resonancia de plasmones de superficie (SPR) en BIAcore®.

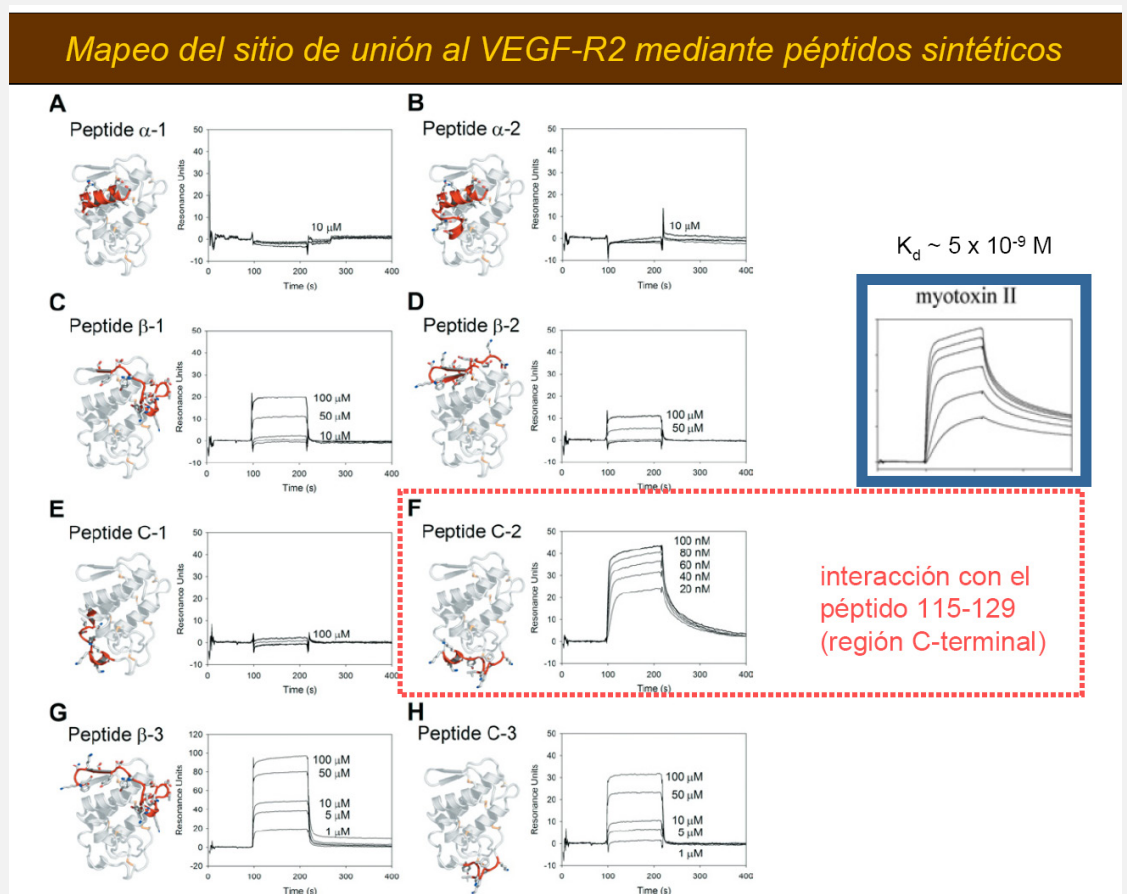


Figura 2: Evaluación de la interacción de diversos péptidos sintéticos que cubren la secuencia completa de aminoácidos de la miotoxina II de *Bothrops asper* de Costa Rica (paneles A-H) con el receptor VEGF-R2 inmovilizado sobre un chip de BIAcore®. El péptido 115-129 (panel F) reproduce la interacción que se observa al utilizar la toxina completa (recuadro inserto a la derecha). Adaptado de Fujisawa et al. (2008).

PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA GENERAR ANTICUERPOS HACIA SITIOS PREDETERMINADOS DE MIOTOXINAS

Mediante la inmunización de animales de experimentación con péptidos sintéticos que corresponden a segmentos particulares de un antígeno proteico (y acoplados covalentemente a una proteína inmunogénica que actúe como transportador), es posible obtener anticuerpos hacia sitios predeterminados del antígeno. Pese a su naturaleza polyclonal, estos anticuerpos van a poseer una especificidad restringida, predefinida por el péptido empleado durante la inmunización. En ocasiones, tales anticuerpos son capaces de reconocer al epitopo correspondiente de la proteína completa en su estado nativo, lo cual los convierte en una herramienta muy útil para su caracterización inmunoquímica y funcional.

En el caso de la miotoxina II (Lys49) de *Bothrops asper*, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra su segmento C-terminal 115-129 son capaces de reconocerla y neutralizar su acción lítica sobre células en cultivo, así como su acción miotóxica en animales (Calderón y Lomonte, 1998), en concordancia con el modelo que propone que este sitio es crucial para la toxicidad de las miotoxinas tipo Lys49. Además, se ha explorado el potencial del péptido sintético 115-129 como inmunógeno para la generación de anticuerpos que protejan de la mionecrosis causada por la miotoxina II, en un modelo de ratón. Dicho péptido sintético, acoplado al toxoide diftérico en una proporción molar de 3:1, indujo en los ratones inmunizados una protección cercana al 50% en términos de necrosis de fibras musculares, en comparación con el grupo de animales no inmunizados, luego de someter ambos grupos a la inyección intramuscular de una dosis de reto de la miotoxina (Calderón y Lomonte, 1999). Aunque la protección inducida mediante la inmunización con miotoxina completa fue superior a la observada al inmunizar con el péptido sintético de la región C-terminal, el estudio demostró en principio que es posible reducir el daño tisular ocasionado por miotoxinas, empleando como inmunógeno apenas un corto segmento sintético de su estructura.

Las actuales facilidades para la síntesis de péptidos y su costo decreciente hacen atractiva la opción de considerar a los péptidos sintéticos como potenciales inmunógenos, con aplicabilidad en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra diversos tipos de toxinas de importancia médica.

PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE EPITOPOS LINEALES EN MIOTOXINAS

Los epitopos, o sitios de un antígeno que son reconocidos por el sistema inmune adaptativo (B y T) de un individuo que es expuesto a él, pueden clasificarse en dos grupos generales. Unos, denominados secuenciales, lineales, o continuos, están formados por aminoácidos contiguos en la secuencia, en el caso de las proteínas. Los otros, llamados discontinuos o conformacionales, se forman por la yuxtaposición de aminoácidos que no son contiguos en la estructura primaria, pero que se aproximan entre sí gracias a los plegamientos que conforman la estructura secundaria y terciaria (o cuaternaria) de las proteínas. Aunque estos últimos epitopos son difíciles de reproducir empleando péptidos sintéticos, los epitopos lineales son fácilmente representables me diante esta estrategia.

Con la finalidad de ubicar cuáles son las regiones lineales de una proteína que el sistema inmune adaptativo humoral de un individuo reconoce, es posible preparar una colección de péptidos traslapados, que cubran la secuencia completa del antígeno, y enfrentarlos, mediante algún tipo de prueba inmunológica, contra el suero del individuo (o individuos) inmunizado. Esta estrategia de análisis provee información relevante para comprender las características moleculares de la respuesta de anticuerpos contra una determinada proteína inmunogénica, lo cual posee gran relevancia en el caso de toxinas, dado que la generación y administración de anticuerpos neutralizantes es la piedra angular para la terapia de muchos tipos de envenenamientos.

La miotoxina II de *Bothrops asper* ha sido recientemente estudiada mediante esta estrategia, con el fin de identificar cuáles son sus principales epitopos lineales reconocidos por anticuerpos en una respuesta inmune. Para ello se evaluó el reconocimiento por parte de animales inmunizados con la toxina purificada, empleando conejos, así como el reconocimiento por parte de los equinos que son sometidos a inmunización con venenos completos (incluyendo a la especie cuyo veneno contiene dicha toxina). Una serie de 56 péptidos dodecaméricos que cubre la secuencia completa de la miotoxina II, con un desplazamiento o traslape de 2 residuos, se enfrentó a los distintos tipos de sueros (tres lotes de anti-venenos equinos de uso terapéutico, o un lote de suero de conejo anti-miotoxina II) empleando un ensayo inmunoenzimático basado en la captura de los péptidos biotinilados mediante estreptavidina acoplada a una fase sólida (Lomonte, 2012). Algunos de los epitopos lineales identificados fueron compartidos en las dos especies evaluadas, mientras que otros fueron únicos, como se muestra en la Figura 3. Además, se observó ciertas diferencias entre los lotes de antiveneno equino, en cuanto a su reconocimiento a nivel de epitopos. El conocimiento sobre la manera en que los anti-venenos de uso terapéutico reconocen a las toxinas ofídicas, por ejemplo, es muy limitado. Sin embargo, su comprensión podría tener implicaciones importantes para mejorar en este tipo de medicamentos, mediante estrategias de inmunización con toxinas recombinantes, epitopos sintéticos, o segmentos génicos codificantes por toxinas, por ejemplo.

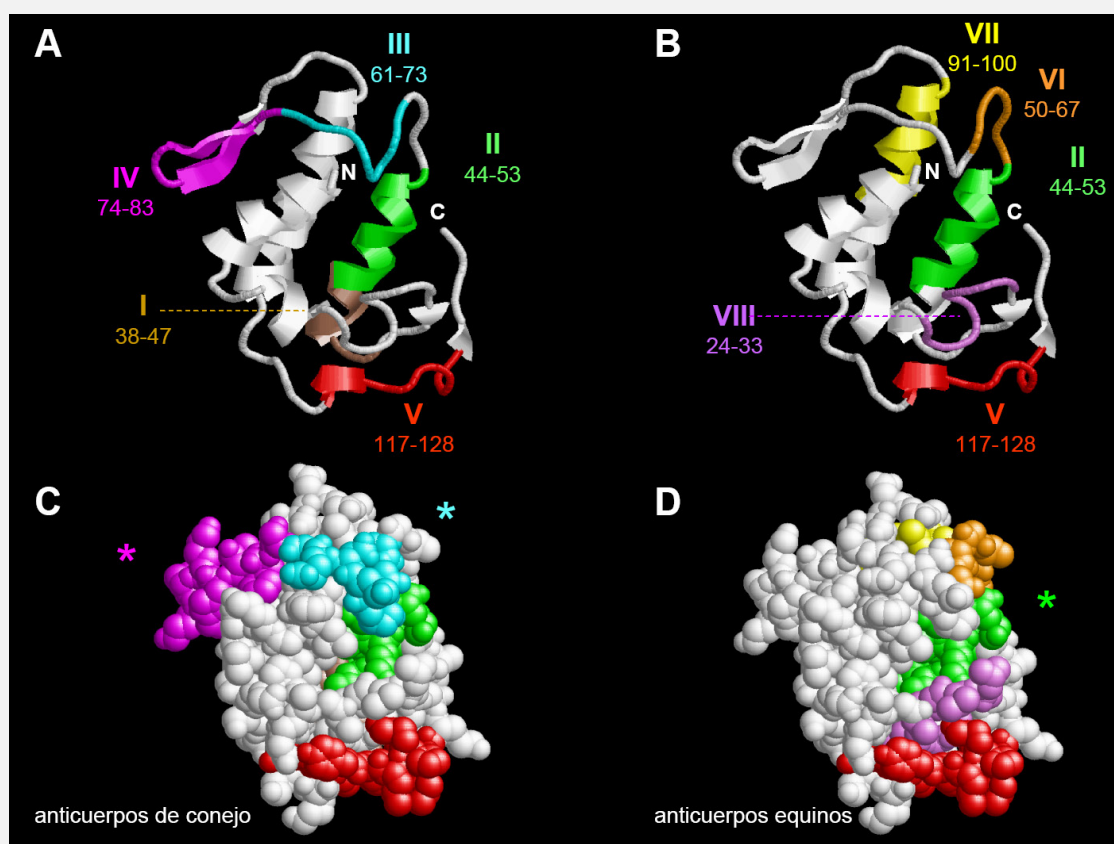


Figura 3: Identificación de epitopos lineales de la miotoxina II de *Bothrops asper* de Costa Rica, reconocidos por anticuerpos de conejo anti-miotoxina II (paneles A y C) o por anticuerpos presentes en el antiveneno terapéutico de origen equino (paneles B y D) utilizado en los envenenamientos ofídicos en Centroamérica. Los asteriscos señalan a los epitopos más intensamente reconocidos en el ensayo inmunoenzimático. Adaptado de Lomonte (2012).

AGRADECIMIENTOS

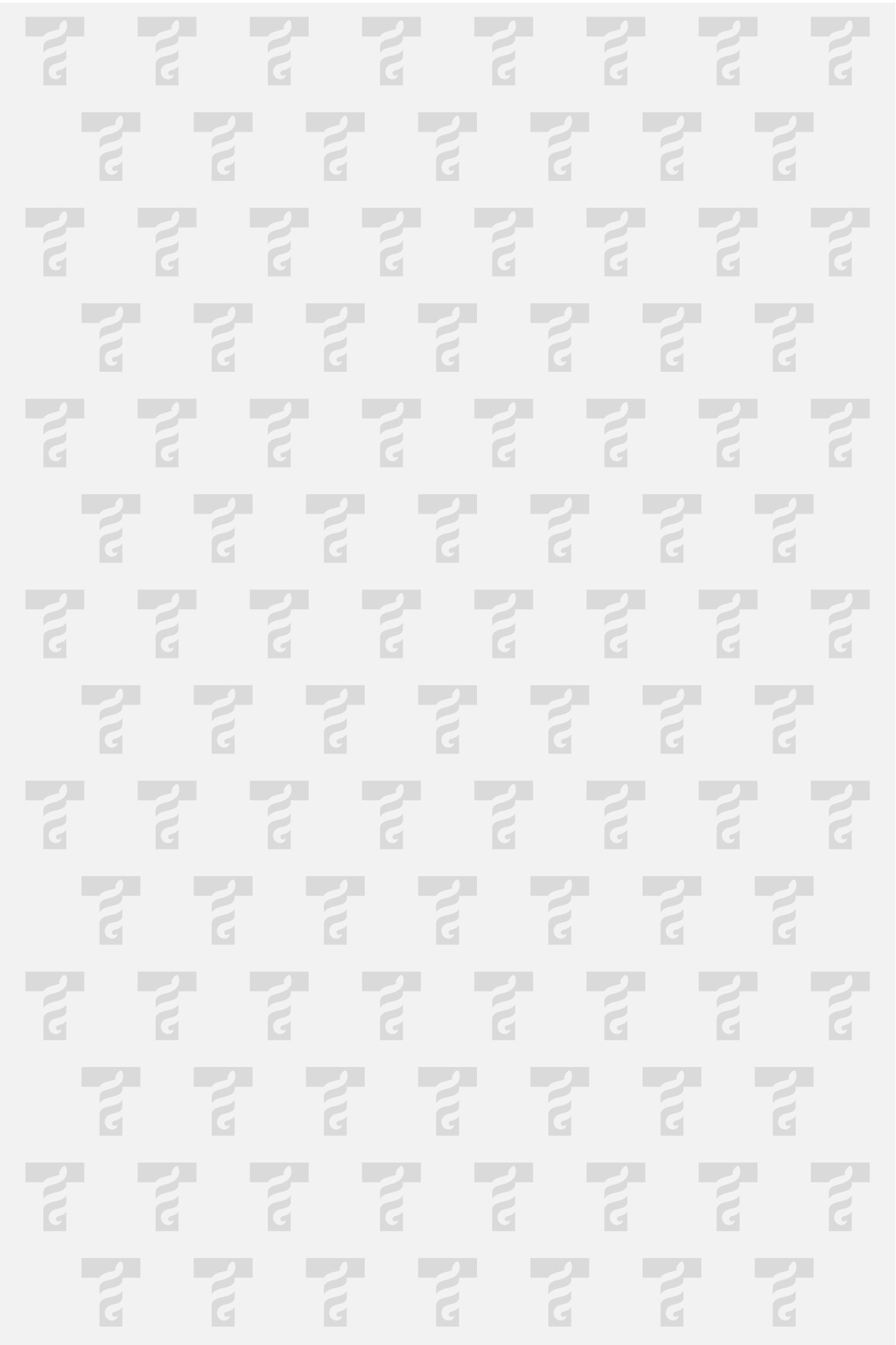
El autor agradece la colaboración de numerosos colegas y estudiantes en las investigaciones citadas en el presente resumen, así como el apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, del International Center of Genetic Engineering and Biotechnology, del Programa CYTED, y de la red NeTropica de colaboración Suecia-Centroamérica.

BIBLIOGRAFÍA

- Angulo Y, Lomonte B, 2005. Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochem. Funct.* 23, 307-313.
- Calderón L, Lomonte B, 1998. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. *Archs. Biochem. Biophys.* 358, 343-350.
- Calderón L, Lomonte B, 1999. Inhibition of the myotoxic action of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic peptide 115-129. *Toxicon* 37, 683-687.
- Fujisawa D, Yamazaki Y, Lomonte B, Morita T, 2008. Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via C-terminal loop region. *Biochem. J.* 411, 515-522.
- Gutiérrez JM, Lomonte B, 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405-1424.
- Hackeng TM, Nounier CM, Bon C, Dawson PE, Griffin JH, Kent SBH, 1997. Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7845-7850.
- Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LÅ, Maccarana M, 1994. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem.* 269, 29867-29873.
- Lomonte B, Angulo Y, Calderón L, 2003a. An overview of Lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885-901.
- Lomonte B, Angulo Y, Santamaría C, 2003b. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. *Toxicon* 42, 307-312.
- Lomonte B, Gutiérrez JM, 2011. Phospholipases A2 from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle

damage? *Acta Chim. Slovenica* 58, 647-659.

- Lomonte B, Rangel J, 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520-530.
- Lomonte B, 2012. Identification of linear B-cell epitopes on myotoxin-II, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 60, 782-790.
- Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B, 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897-2912.
- Núñez CE, Angulo Y, Lomonte B, 2001. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39, 1587-1594.
- Páramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerdá J, Bengoechea JA, Gorvel JP, Moreno E, 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253, 452-461.
- Renetseder R, Brunie S, Dijkstra BW, Drenth J, Sigler PB, 1985. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* 260, 11627-11634.
- Yamazaki Y, Matsunaga Y, Nakano Y, Morita T, 2005. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of Eastern cottonmouth: a new role of snake venom myotoxic Lys49-phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 280, 29989-29992.



MONOCAPAS Y BICAPAS LIPÍDICAS EN EL ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE BIOCOMPUESTOS ACTIVOS CONTRA BIOMEMBRANAS. MODULACION SUPRAMOLECULAR DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN SUPERFICIES LIPÍDICAS.

Bruno Maggio

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)- Depto. De Química Biológica, Fac. Cs. Químicas. CONICET-Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre y Medina Allende. Ciudad Universitaria, X5000HUA Córdoba, Argentina.

ABSTRACT

Biomembranes contain a wide variety of lipids and proteins within an essentially two-dimensional structure. The coexistence of such a large number of molecular species causes local tensions that frequently relax into a phase or compositional immiscibility along the lateral and transverse planes of the interface. As a consequence, a substantial microheterogeneity of the surface topography develops and that depends not only on the lipid-protein composition, but also on the lateral and transverse tensions generated as a consequence of molecular interactions. The presence of proteins, membrane active enzymes that modify membrane lipid composition and immiscibility among lipids, constitute major perturbing factors for the membrane sculpturing both in terms of its surface topography and dynamics. In this work, we will summarize some recent evidences for the involvement of membrane-associated, both extrinsic and amphitropic, proteins as well as membrane-active phosphohydrolytic enzymes and sphingolipids in driving lateral segregation of phase domains thus determining long-range surface topography.

Supported by MINCyT (CONICET, FONCyT), MINCyT-Córdoba (ACC), SECyT-UNC.

KEY WORDS: Surface topography, sphingolipids, lipid monolayers, bilayer vesicles, phospholipases.

RESUMEN

Las biomembranas contienen una gran variedad de lípidos y proteínas organizados en una estructura esencialmente bi-dimensional. La coexistencia de tal heterogeneidad composicional causa tensiones locales cuya relajación frecuentemente lleva inmiscibilidad entre los componentes y/o a segregación del estado de fase a lo largo y a través del plano de la bio-interfase. Como consecuencia, se desarrolla una considerable microheterogeneidad topográfica que depende no solamente de la composición lípido-proteína sino también de las tensiones laterales y transversales generadas por la adaptación termodinámica de las interacciones intermoleculares locales. La presencia de proteínas, enzimas activas contra componentes de la membrana que causan cambios de la composición de la misma o inmiscibilidades entre los componentes constituyen factores de gran importancia para la dinámica estructural. En esta presentación se tratará de resumir evidencias del efecto de lípidos, proteínas y enzimas fosfolíticas en el establecimiento de segregación de dominios con diferente estado de fase y como ello determina la topografía general de la superficie.

Financiado por MINCyT (CONICET, FONCyT), MINCyT-Córdoba (ACC), SECyT-UNC.

PALABRAS CLAVES: Topografía de superficie, esfingolípidos, monocapas lipídicas, vesículas bicapa, fosfolipasas.

INTRODUCTION

Membrane structures have revealed an extraordinary polymorphism having a complex dynamics. Understanding their behavior on molecular terms actually means dealing with physico-chemical properties of interfaces, and vectorial self-structuring of amphipathic molecules. This is because membrane behavior corresponds to that of anisotropic visco-elastic fluids, whose structural dynamics involves many correlated parameters. These determine and control surface

miscibility of components, phase state, domain segregation, surface curvature and structural topology, as well as exchange of molecular information along and across the membrane. Understanding the molecular principles underlying the self-structuring of such polymorphic liquid–crystalline phases, one of the most complex and least understood states of matter, adds further complexity and limitations because precise molecular control at each level of inspection is required in order to reach valid conclusions. It has always been difficult to represent the complex molecular events involving many simultaneous interactions and local biocatalytic reactions that modify membrane composition, miscibility–immiscibility processes, thermodynamic and mechanical dissipation of tensions, and the structural outcome underlying biomembrane information transduction.

The easy solution has been to oversimplify and represent molecular properties and interactions in isolation and independently. The problem is not oversimplification itself but that its overuse brings about the detrimental result of ending up substituting reality for fiction, with erroneous concepts that may remain entrenched in their use for many years. As it is well known by most serious investigators, events in membranes do not follow the simple illustrations usually represented in biochemistry and cell biology textbooks but involve complex dynamic transduction of information over different levels of organization.

During the late 1970s increasing experimental evidences began to point out the synergy of molecular factors involved in membrane behavior (for references see below). From 1976 our laboratory initially referred to this point with an emphasis on glycosphingolipids in relation to interactions with membrane components of nerve cells in 1981, advanced this concept with new integrated evidences in 1994, and again updated it in 2004 and 2006. Since 2002 the term “lipidomics” began to be used, mostly with respect to the analysis, molecular properties, and metabolism of lipids in the context of their cellular function, in order to point out the complexities introduced by the extraordinary chemical variations

of these molecules. However, even knowledge on the Biochemistry, chemical composition, and cellular function of lipids has increased, integration of these aspects with the underlying biophysical properties remains at an initial stage and is often controversial due to quite different conceptual approaches existing between biologically and biophysically oriented research. Detailed examples are included in my presentation and course for students given in the Workshop held as part of the activities within the CYTED Program of the net BIOTOX: “Toxinas de Interés para la Biomedicina” that took place between 6th to 10th August 2012 at the Instituto Clodomiro Picado, San José Costa Rica. Specific reviews published by our group that include all the topics and discussions covered in my workshop presentation are quoted at the end of this document.

MOLECULAR-TO-SUPRAMOLECULAR INFORMATION TRANSDUCTION IN THE MEMBRANE SCENARIO

Though not always recognized, practically all we know on the structural dynamics of cell membranes was derived from a rich background of a few biophysical properties of membrane molecules obtained with model systems. This begins with the very concept of lipid-protein bilayer structure for a cell membrane of paramount importance for cell biology which originated from the Gortel & Grendell studies with Langmuir monolayers at the air-water interface in 1925. The cumulative basic studies performed have shown that molecular information transduction involves much more than biochemically intertwined sequential reactions, receptor-ligand recognition, phosphorylation cascades and activation/inhibition of membrane-associated enzymes. The whole membrane structure, and beyond, is involved since each of these effects occur with changes of chemical structure, molecular configuration, or associations. It is thus thermodynamically unavoidable that they become amplified, balanced, translated and modulated through variations of molecular interactions (thus determining lateral miscibility, phase state and surface topography) and molecular geometry, surface elec-

trostatics and viscoelastic tensions (thus controlling interfacial curvature and long-range communication across the lateral and transverse planes of the membrane), that take place over different dimension scales.

The concept of scale dimension is rarely considered but it is central to understanding the molecular behavior of biomembranes. On a molecular scale, the very slow transfer of membrane molecules to the aqueous environment, compared to the rate of lateral diffusion, means that the anisotropically restricted membrane surface behaves nearly as a closed system with a fixed bulk composition for relatively long (in terms of molecular events) periods of time (minutes to hours). Within this context, most of the “average” surface parameters are measured over a space-time scale that involves a sufficient number of molecules such that the individual molecular fluctuations are small. For biomembranes, the structure can be considered to follow some “continuum” law in the two-dimensional plane because the third dimension, thickness, represents a structural and thermodynamic discontinuity. The fluctuations of a surface property are inversely proportional to the square root of the number of molecules considered within the scale of the continuum. Consequently, average surface properties regarding the intermolecular organization represent the ensemble of many fast and local molecular events, integrated over a scale that spans at least fractions of μm and relatively long times, which also comprises the composite thickness dimension of a particular membrane region. Thus, interpreting the molecular codes underlying the membrane structural dynamics requires insights into the elusive structural-temporal dimension accurately denominated the “mesoscopic level”. In this restricted zone, events take place beyond the size and fluctuations of individual moieties, while not yet in the macroscopic environment and sizes of functional membranes of cellular organelles.

One of the major parameters that influences, and responds to, variations of the molecular packing is the two-dimensional (lateral) surface pressure acting on the

molecules at the interface. It arises mainly from the balance between hydrophobic effect that entropically tends to separate out non-polar moieties from the aqueous phase (thus forcing the energetically unfavorable formation of a hydrocarbon–water interface) while simultaneously overcoming the repulsive tendency to pack of the polar head groups. The surface pressure represents a time- and space-averaged parameter for which the amplitude and frequency of fluctuations depend on the molecular thermal energy, in-plane elasticity and surface viscosity. Besides homo- or hetero-tropic interactions, the average molecular area exhibited by a defined class of lipid or protein at the interface varies according to the surface hydration, state of protonation, ion binding, and the lateral surface pressure. Thus, it is quite inevitable that the molecular area and dipole potential density also fluctuate within a defined range about the average value, in correspondence with the surface pressure, propagating as either in-phase or out-of-phase structural waves depending on the surface elasticity and/or retardation by viscoelastic relaxation. The values of “average” monolayer surface pressure that have been attempted to correlate to that of bilayers and natural membranes are in the range of 30–35 mN/ m. However, the query on what could be the surface pressure corresponding to that of a compositionally complex interface such as that of a natural membrane has little meaning because the mean value actually exhibits large fluctuations that can span from ± 5 mN/m to more than 25 mN/m, depending on the surface compressibility. Such fluctuations occur in a time range from nano- to micro-seconds depending on the surface elasticity and the average size of the domain over which the fluctuation is felt.

The actual value of the surface pressure, and its fluctuations in time, is due to the transfer of momentum during collisions between the molecules forming the surface and by surface osmotic effects due to the lower water chemical potential at the interface. Thus, the lateral pressure is influenced by the average (and thus also fluctuating) thermal energy, steric hindrance, hydration, electrostatic, repulsive

or cohesive interactions in the membrane. Furthermore, variations of the mean molecular area directly translate to changes of interfacial polarization density thus controlling surface electrostatics that extends into the aqueous milieu thus transducing information between the membrane and its environment.

Topographically, the time-dependent lateral pressure waves are reflected in the average phase state and its transition cooperativity; the in-plane elasticity and vectorial shear tensions can adsorb, dampen or amplify those variations. If the compressibility of the surface phase is approximately isotropic along the lateral plane (i.e., in the absence of shear viscosity), the stress generated by pressure fluctuations may be propagated as more or less uniformly dampened oscillations. However, if less deformable barriers (such as the presence of

segregated domains with more condensed phase states) are encountered, changes of interactions and/or isothermal phase transitions could be expected along the perturbation path. The kinetics for formation of phase segregated domains having a relatively small number of molecules, or large scale (critical) phase fluctuations, is well within the time range of surface pressure fluctuations; this is about 2–4 orders of magnitude faster than the catalytic rate of membrane-associated enzymes. On the other hand, if the lipid polar head groups contain net charges, pressure induced fluctuations of the molecular packing will also be transduced to concerted fluctuations of the surface electrostatics, both laterally and perpendicularly to the membrane plane, coupled to oscillating variations of the double layer potential extending into the aqueous medium depending on the electrolyte concentration.

BIOCATALYTIC-STRUCTURAL CROSS-TALK AT THE MEMBRANE INTERFACE

Membrane-associated enzymes, either being proteins integral to the membrane or the large class of amphitropic proteins that can reversibly interact with membrane surfaces,

express activity depending on subtle changes of molecular organization in the protein itself or at the membrane surface. This includes practically all types of enzymes that are of paramount importance for membrane signal transduction or membrane toxicity and whose activity responds to, and in essence regulates, membrane composition and structure. Although it has not yet been adequately incorporated in the conceptual framework of biochemistry and cell biology, the two-dimensional surface has an extraordinary capacity to translate, with amplification, very minor local variations of chemical structure due to the non-linear dissipation of thermodynamic and geometric tensions, resulting in major supramolecular and topological events that, in turn, affect and regulate membrane metabolism itself. Not surprisingly, the varied effects of the structural dynamics have profound influences on the activity of enzymes acting in and against membranes. This is a key aspect of molecular information exchange at which the varied polymorphism of most membrane lipids constitutes a unique membrane phenomenon right at the mesoscopic level. It represents a multidimensional linking point between the local molecular events of metabolism (which are opened to the interrelated pathways of biochemistry) and the supramolecular membrane dynamics affecting structural recombinations influencing inner and outer cellular communication (with translation to most functions in cell biology).

Specifically related to work carried out in our laboratory, many examples exist demonstrating a rich participation of sphingolipids in the control of enzyme activity at the membrane level. Almost 30 years ago it was first demonstrated that gangliosides activated Mg^{2+} -ATPase strongly and Ca^{2+} -ATPase slightly in deoxycholate-treated rat brain microsomal fractions while the Na^{+}/K^{+} -ATPase in synaptosomal membranes was inhibited by mixed gangliosides and the Mg^{2+} -ATPase was not found affected. Gangliosides have been shown to affect various protein kinases (calmodulin-dependent, phospholipid-dependent and others) in different neural systems and cells and both stimulatory and inhibitory

effects on protein phosphorylation by different mechanisms were reported. With respect to neuraminidase, the rates of hydrolysis of gangliosides by the *Vibrio cholerae* enzyme are larger for membrane-bound than for monomer or micellar gangliosides. Since the sialidase has no recognition site for the ganglioside aglycon, the changes of activity must be obviously due to accessibility of the sialosyl residue toward the aqueous medium; therefore, the lateral and/or transverse organization at the interface, with its consequence on oligosaccharide chain orientation come into play. The rate of activity of neuraminidase can be finely regulated by changes of the membrane phase state and the lateral surface pressure, with the enzyme preferring substrates that are more loosely packed. Correlation of the thermotropic behavior of ganglioside-containing phospholipid bilayers with sialidase activity indicated that the rate of ganglioside degradation by the enzyme can be reversibly regulated by the membrane physical state. The rate of hydrolysis is higher when the gangliosides are homogeneously dispersed along the bilayer surface than when they are present in enriched domains while the affinity for the substrate does not appear to be affected; this is in agreement with the preference of the enzyme to degrade gangliosides at lower lateral surface pressure where the lipids are more loosely packed. It is not the formation of the enzyme–ganglioside complex or the initial sialosyl residue recognition that are regulated by the surface organization but subsequent kinetic steps of the reaction such as the formation or liberation of the product in the membrane. A definite lag-time occurs before the onset of a constant rate of hydrolysis indicating precatalytic events taking place before effective enzyme activation, while penetration of neuraminidase into the ganglioside-containing interface can occur without catalytic activity, meaning that protein domains other than the active site are implicated in its interfacial association.

Regarding phosphohydrolytic enzymes, it has long been known that the membrane intermolecular organization and lipid (substrate and non-substrate) composition have a

profound influence on the enzyme ability to become membrane-associated, as well as to undergo pre-catalytic or catalytic steps required for the in-plane substrate degradation. Also, it was demonstrated that different phospholipases that do not share common lipid intermediates can cross-communicate on biophysical terms at the interface by affecting the activity of independent enzymatic pathways depending on the type and proportion of product/substrate mutually generated and how it affects the surface topography. Several sphingolipids, which are nonsubstrates for phospholipases, can markedly regulate their activity through changes of the lateral organization, phase state or topology of the membrane; with respect to the latter, it was shown that the rate of activity of PLA₂ and PLC is extremely sensitive to the generation of HII-type of structures in the bilayer membrane and varies according to their formation.

Kinetically, there are at least three inter-dependent levels at which the effect of sphingolipids (and other lipids) exert their modulatory effect on the surface reaction: on the initial adsorption/partition or relocation of the enzyme in the interface; on the enzyme precatalytic activation that frequently determines the length of the latency period for activity; the expression of catalytic activity itself through the rate and extent of product formation. On the other hand, the complexity of the regulatory process represents a multiple transducer device in itself since each of these steps can become rate-limiting in a structural- as well as time-dependent manner that is self-controlled to either steady-state, amplification or dampening modes depending on the topological changes at the surface that are continuously evolving during the enzymatic reaction. Several sphingolipids can markedly affect phospholipase activity through their effects on the membrane organization at the various levels. Neither the association of the PLA₂, PLC and SMase to the interface, nor its affinity for the phospholipid substrate, are impaired. Rather, those lipids generally facilitate interfacial enzyme partitioning and shorten or abolish the lag-time for precatalytic activation, irrespective on whether their effect

is to activate or inhibit the steady-state catalytic reaction.

The electrostatic field across the interface, either externally applied or locally exerted by the orientation of resultant dipole moment vector due to the different polarity of the membrane molecules, can markedly affect the phospholipase reaction. For phospholipids, the positive end of the electrostatic field vector of the resultant molecular dipole moment perpendicular to the interface points toward the hydrocarbon chain-methyl end which means that, at the molecular level, activating fields induce phospholipid hyperpolarization while inhibitory fields imply interfacial depolarization; Several natural and chemically modified derivatives of sphingosine, glycosphingolipids or proteins can depolarize or hyperpolarize the interface, with the phospholipase activity responding in concert according to the variations of the interfacial polarization vector and the combined effects of local and externally applied electrostatic fields. We recently showed that glycosphingolipids adsorbed to carbon electrodes affect in a voltage-dependent manner charge transfer reactions and reversible surface reorganization of GalCer occur with marked hysteresis depending on the sign and magnitude of the electrostatic potential applied. For sphingomyelinase, ganglioside GM1 moderately inhibits the activity while asialo-GM1 has no significant effect and sulfatide largely activates phospholipid degradation.

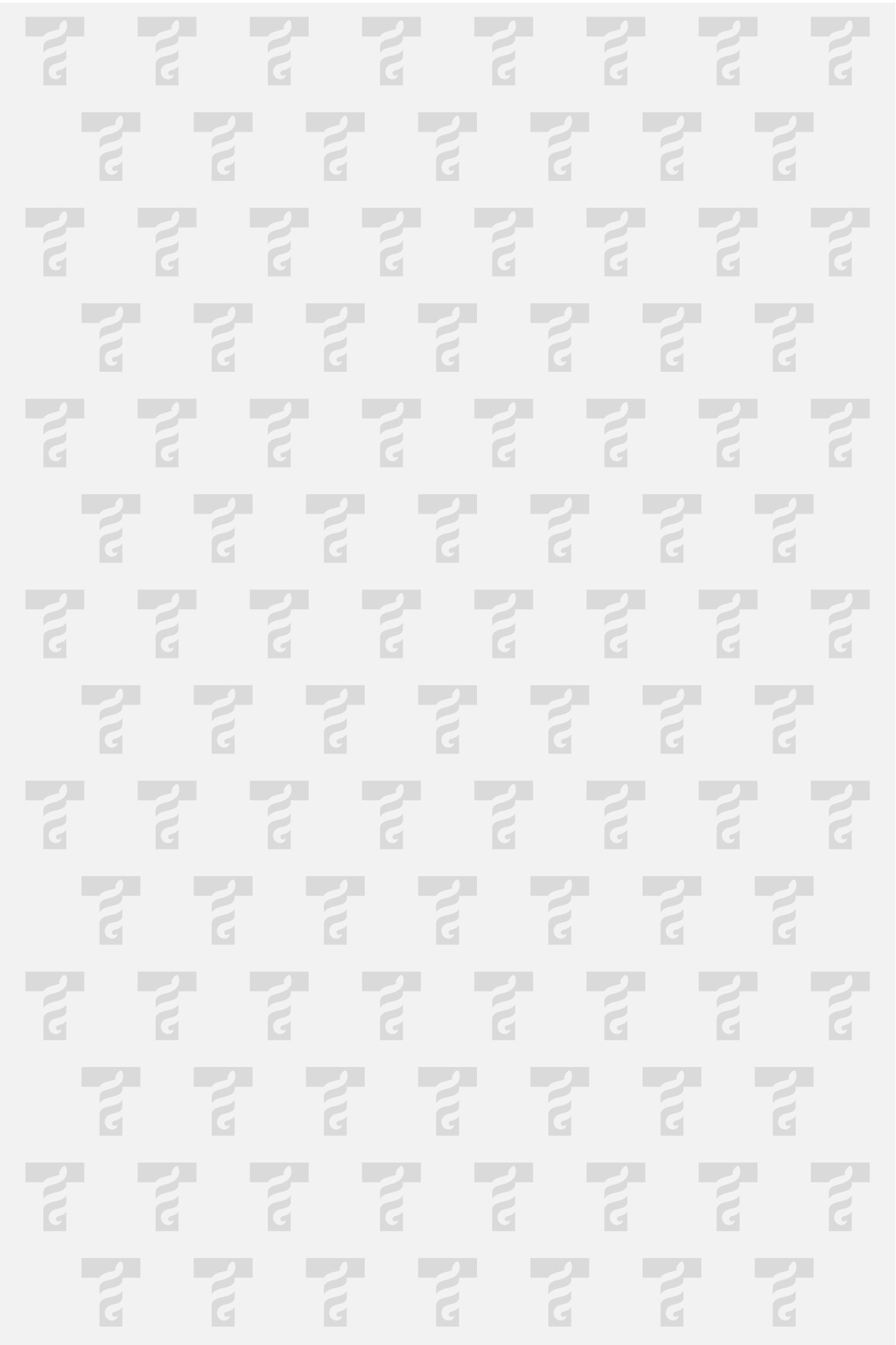
Catalytic formation of ceramide(Cer)-enriched domains by neutral sphingomyelinase (SMase) drives dynamic structural reorganization that controls activity in a bidirectional manner. Real time epifluorescence microscopy of monolayers under the action of SMase provided direct evidence that the enzyme activity continuously alters the surface topography. During the first phase of the enzymatic reaction and up to the end of the latency period phase separated Cer-enriched domains (and lateral defects) increases rapidly in number until reaching a plateau; this first structural threshold point signals a transduction from the local biocatalytic event to a topographically-mediated switch-on of enzymatic activity to a constant rate regime. During the following pseudo-zero-

order catalysis the number of Cer-enriched domains remains unaltered while steadily growing in size. The spatial distribution of domains shows remarkable long-range order and defined lattice superstructuring. In turn, the topographical changes feed back on the local molecular level of the SMase kinetics and a second structural threshold triggers a slowing-down of the catalytic rate and subsequent switch-off of activity. This occurs when the liquid-expanded sphingomyelin-enriched phase (so far constituting the continuous surface phase) becomes “disconnected” by the percolation of the superstructure of condensed Cer-enriched domains, with increase of surface viscosity. These changes are strongly correlated to the induction of domain shape variations and lattice superstructuring, driven by the electrostatic dipole moment density difference between the coexisting phase domains, balanced by the lateral line tension at the domain boundary; in addition, the inter-domain electrostatic energy in relation to the thermal energy determines domain lattice formation. Additional information content and transduction codes are contained in these phenomena since the surface topography of the mixed interface is dependent on the manner in which the compositional changes are generated: the domain pattern, distribution, and percolation point of Cer-enriched domains are different in enzyme-free films in which sphingomyelin and Cer are premixed at the same relative proportions than those derived from the catalytic process. In a fluorescence microscopy study with giant bilayer vesicles, SMase was shown to induce budding of vesicles in a vectorial manner depending on the bilayer half in which Cer is being generated. These findings clearly show the extraordinary richness of structural information transduction to various hierarchical levels, extending far beyond purely biochemical cascades, related to the existence of segregated sphingolipid compositional domains.

REFERENCES

For further references, explanation of the methodologies used and specific discussion of selected examples see the following reviews:

- Maggio, B., Cumar, F.A. & Caputto, R. (1981) Molecular behaviour of glycosphingolipids in interfaces. Possible participation in some properties of nerve membranes. *Biochim. Biophys. Acta (Reviews on Biomembranes)* 650:69-87.
- Maggio, B., Fidelio, G.D., Cumar, F.A. and Yu, R.K. (1986) Molecular interactions and thermotropic behavior of glycosphingolipids in model membrane systems. *Chem. Phys. Lipids* 42:49-63.
- Maggio, B. (1994) The surface behavior of glycosphingolipids in Biomembranes. A new frontier of molecular ecology. *Progr. Biophys. & Molec. Biol.* 62: 55-117.
- Maggio B., Fanani M.L., Rosetti C.M. and Wilke N. (2006). Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. *Biochim Biophys Acta*. 1758:1922-1944
- Maggio, B., Borioli, G.A., Del Boca, M., De Tullio, L., Fanani, M.L., Oliveira, R.G., Rosetti, C.M. and Wilke, N. (2008) •
- Composition-driven surface domain structuring mediated by sphingolipids and membrane/active proteins. Above the Nano- but under the Micro-scale: mesoscopic biochemical/structural cross-talk in biomembranes. *Cell Biochem. Biophys.* 50: 79-109
- Fanani, M. L., Hartel, S., Maggio, B., De Tullio, L., Jara, J., Olmos, F., Oliveira, R.G. (2010) The action of sphingomyelinase in lipid monolayers as revealed by microscopic image analysis *Biochim. Biophys. Acta* 1798(7):1309-1323



INTERACTIONS OF STICHOLYSIN I WITH DPPC/SM BILAYERS. A MOLECULAR DYNAMICS STUDY

**Rodrigo Montecinos^{1,*}, Eduardo Lissi², Carlos Alvarez³,
María Eliana Lanio³, Fabiola Pazos³**

1. Departamento de Química-Física. Facultad de Química.
Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile*
e-mail: rmontecinoe@uc.cl

2. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago
de Chile (USACH). Santiago. Chile

3. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
La Habana. Cuba

ABSTRACT

Actinoporins are a family of cytolytic proteins, obtained from different sea anemones, which present a high structural homology and a high affinity for sphingomyelin (SM). St-I is a potent cytolytic protein composed of 176 amino acids, with a conserved aromatic region bearing Trp and Tyr residues that conform the lipid-binding site cluster as in other members of the family (St-II and Eq-II). MD simulation has been used to analyze the structure of St-I monomer with the N-terminal helix unfolded and its interactions with the membrane surface formed by DPPC/SM phospholipids. The results of 100 ns simulations of a system composed by lipids, St-I, water and ions evidence the preferential binding of actinoporins to SM lipids. The interaction between amide groups in SM and W-111 can explain the preferential association between actinoporins and SM through amide- π interactions. Finally, MD simulation indicates that electrostatic interactions are the main driving forces in the first steps of the pore formation process.

INTRODUCTION

Actinoporins are a family of cytolysins, obtained from different sea anemones, which present a high structural homology, high pI, and molecular weights of about 20 kDa. (Belmonte, G. et al. 1993; Macek et al. 1994). They are efficient pore-forming toxins (PFT) with high affinity for sphingomyelin (SM) (Belmonte et al., 1993; Alvarez-Valcarcel et al., 2001; Martínez et al., 2007). The structure of the actinoporins consists of 10 β -strands between two α -helices forming a β -sandwich (Athanasiadis et al., 2001; Mancheño et al., 2003). In the last years, several studies have proposed at least four steps in the mechanism of pore formation (Menestrina et al., 1999; Malovrh et al., 2000; Hong et al. 2002; Anderluh et al., 2005; Alegre-Cebollada et al., 2007; Lam et al., 2010): i) from the soluble structure of the toxin to a membrane-bound form with an aromatic cluster interacting with lipids (Mancheño et al., 2003), ii) a membrane-bound non-lytic structure with the N-terminal segment deployed on the membrane surface, and iii) an oligomeric lytic structure with 3 or 4 N-terminal helices inserted in the membrane forming a pore with a toroidal arrangement of the lipids (De los Rios et al., 1999; Menestrina et al., 1999; Malovrh et al., 2000; Hong et al. 2002; Anderluh et al., 2005; Alegre-Cebollada et al., 2007; Lam et al., 2010). However, this mechanism has some uncertainties about the existence of a trimeric, tetrameric (Alvarez-Valcarcel et al., 2001) and nonameric structures (Mechaly et al., 2011). On the second step, the toxins can change its structure deploying the N-terminal α -helix without altering the fold of the β -sandwiches (Menestrina et al., 1999; Alvarez et al. 2003; Alegre-Cebollada et al., 2007). It has been demonstrated that the N-terminal α -helix has an amphiphilic character and that it plays an essential role in their cytolytic effect (Drechsler et al., 2006). Sticholysin I (St-I) and Sticholysin II (St-II) are a water soluble toxin with an elevated cytolytic activity, isolated from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus* (Tejuca et al., 1996; Huerta et al. 2001). St-I is composed of 176 amino-acidic residues, with a conserved aromatic cluster composed

of W and Y residues that conform the lipid-binding site (Mancheño et al., 2003). Despite of the high homology (identity 93%) between sticholysins, St-I exhibits 6 fold less hemolytic activity (HA) than St-II regarding disruption of the membrane in human red blood cells (Huerta et al., 2001). Moreover, HA comparison between St-II and other actinoporins like equinatoxin II (EqII) from *Actinia equina* (identity 66%) show different activities under the same experimental conditions (Alvarez et al., 2009). MD simulation has been used to analyze the structure of St-I monomer with the N-terminal helix unfolded and its interactions with a membrane like surface formed by DPPC and SM phospholipids. The MD model is compared with previous experimental and theoretical studies performed using St-I (Castrillo et al., 2010), St-II (Kem and Dunn, 1988; Lanio et al., 2001; Alegre-Cebollada et al., 2008) and Eq-II (Macek and Lebez 1988; Lam et al., 2010).

EXPERIMENTAL

Molecular dynamics (MD) simulations were performed using St-I structure, obtained from 2KS4 of Protein Data Bank (fig. 1a) (Castrillo et al., 2009). The toxin structure was modified to adopt the conformation described in previous reports (Anderluh et al., 2000; Anderluh et al., 2005; Drechsler et al., 2006) with 30 residues of the N-terminal segment unfolded (fig. 1b). This last structure was inserted to 1 nm of a surface of a pre-stabilized membrane. The starting system was composed of 176 DPPC, 176 sphingomyelin (18:0) solvated with 30716 SPC water molecules and 60 Na⁺ cations and 63 Cl⁻ anions and a St-I molecule with an unfolded structure. Five systems were tested with St-I molecules oriented in different directions. The lower potential energy system was employed in further analysis. All MD simulations were performed using the program GROMACS version 4.5.3 (Van Gunsteren and Berendsen, 1990; Berendsen et al., 1995) in the isothermic-isobaric ensemble. The employed force field was a combination of two potentials: GROMOS53a6 force field parameters were used for all atoms in protein, i.e. bond stretchings, angle bendings, torsions, out of plane bendings

and Lennard–Jones interactions, and Berger parameters (Berger et al., 1997) were used to describe the interactions of the aliphatic chains. The united atom approximation was used for all hydrogens in the aliphatic chains of DPPC ((Tieleman and Berendsen, 1996) and SM except for polar hydrogens in ceramide group (Niemelä et al., 2004). The Ryckaert–Belleman²⁹ potential function (Ryckaert and Belleman, 1978) was employed to calculate the potential energy of the aliphatic chain torsions. LINCS (Hess et al., 1997) was used to constrain the bond lengths of the lipid chains and SETTLE (Miyamoto and Kollman, 1992) to restrict the structure of the water molecules. A 1 nm cut-off was used for the Lennard–Jones potential and the real space electrostatic interactions. Long range electrostatic interactions were calculated using PME (Darden et al., 1993). Water molecules were represented by the SPC model (Berendsen et al., 1981). The neighbor list was updated every 10 time steps. To maintain the temperature and pressure at 315 K (protein, lipids, water and ions coupled independently) and 1 bar, the weak coupling algorithm of Berendsen was used, with time constants of 0.1 and 1 ps, for T and P, respectively (Berendsen et al., 1984). The time step size in all simulations was 3 fs. An initial 300 ps system equilibration run with protein atoms positionally restrained were performed for all simulations, followed by 100 ns of restrain-free simulations.

RESULTS AND DISCUSSION

Incluir estructuras de lípidos y texto, texto sobre preequilibrio y nanodominios SM-PC

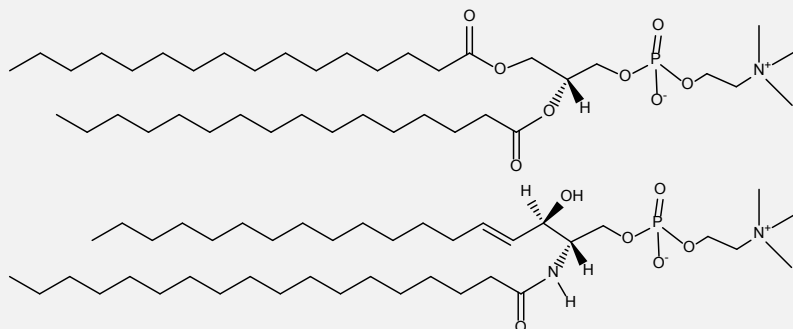


Figure 1a shows the structure of St-I obtained from 2KS4 of Protein Data Bank (Castrillo et al., 2009). From the results obtained from surface plasmon resonance experiments (Hong et al., 2002), we generate a model of St-I structure with the unfolded segment N-terminal (fig 1b).

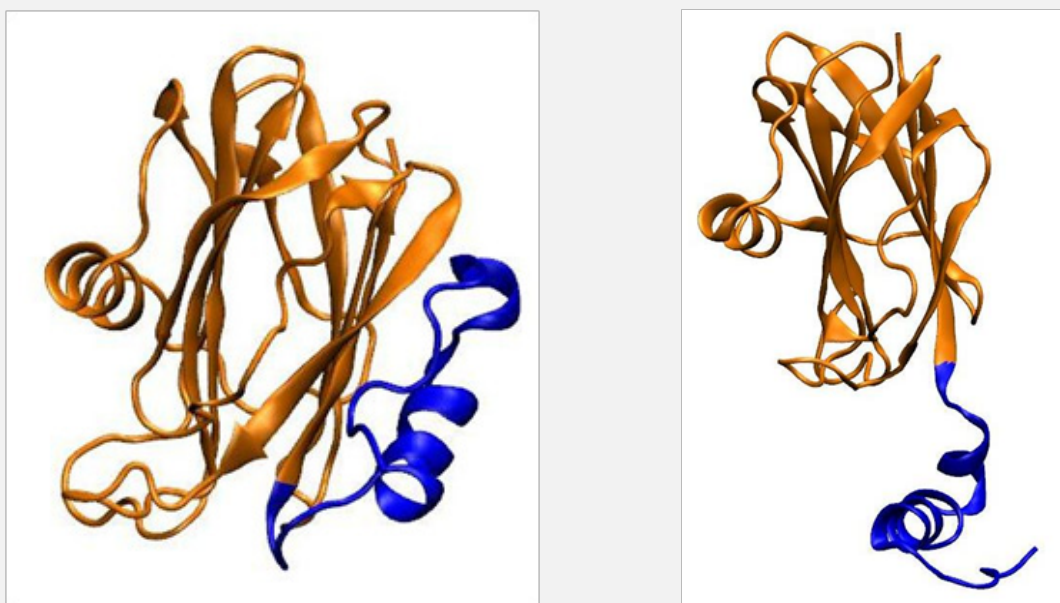


Figure 1. a) NMR structure of St-I (PDB ID: 2KS4) showed in ribbon representation. Residues 1-30 of N-terminal segment are represented in blue. b) Theoretical structure of St-I with unfolded 1-30 residues of the N-terminal segment.

residues. This hypothetical protein conformation would be the structure at the water-membrane interface, previous to the insertion in the membrane (Menestrina et al., 1999; Alegre-Cebollada et al., 2007). Although, this step seems to be coupled to an oligomerization process (Macek et al., 1995) the driving forces leading to release of N-terminal segment

from the body of toxin is not completely known.

Figure 2 shows two snapshots of the structure of the St-I-membrane system with lowest potential energy. In the figure 2a, the aromatic cluster of the toxin, formed by W-111, Y-112, W-115, Y-132, Y-136 and Y-137 residues, are oriented towards the lipid surface. Interestingly, Y-112 and Y-136 are positioned interacting with the surface lipids, maximizing the interaction with a SM molecule (fig 2b). These associations are in agreement with those observed in the crystallization of St-II in presence of phosphocholine molecules (POC) (Mancheno et al., 2003), where POC choline moiety interacts with the rings of Y-111 and Y-135 (Y-112 and Y-136 in St-I) through cation- π interaction (Alvarez et al., 2009). On the other hand, Castrillo and co-workers studied St-I–dodecylphosphocholine (DPC) micelles interaction (Castrillo et al., 2010) using NMR techniques. They suggest that the potential orientation of the aromatic side chains of Y-112 should be pointing out and not interacting with the membrane surface.

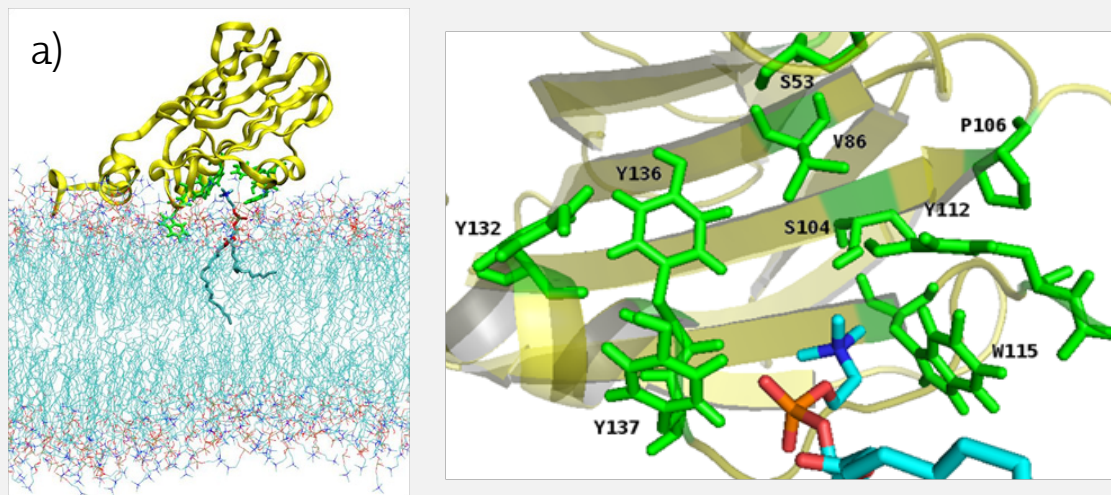


Figure 2. (left) Representation of the simulated system containing DPPC, SM and a St-I unfolded (yellow). Aromatic cluster (green) and SM molecule (cyan) are shown in stick representation. Water molecules and ions have been removed for simplicity. (right) Close up of the binding-site composed by the side chains of S53, V86, S104, P106, Y112, W115, Y132, Y136, and Y137 in presence of a fraction of a SM molecule.

Differences observed with the results of Castrillo et al. could be explained in terms of the different shape of lipids and its supramolecular organization. The molecular shape of lipids depends on the relative volumes of their polar headgroup and apolar acyl chains. Depending of their relative volumes, phospholipids can adopt molecular shapes such as cylinder, cone or inverted cone. Packing of the different molecular shapes can generate different supramolecular organizations such as micelles, lamellar, and hexagonal or cubic phases. DPC assemblies form a micellar structure, while the molecular packing of DPPC-SM generates a bilayer (lamellar) organization. Micelles present a larger surface curvature than bilayers. Therefore, DPC micelles present a larger spontaneous curvature than DPPC/SM bilayers, likely altering the region of contact between the membrane and the aromatic cluster of the toxin. Furthermore, different molecular packing of mixed lipids with different shapes induces heterogeneous lateral organization in the membranes called lipid rafts (Simons and Ikonen, 1997; Brown and London, 1998; Simons and Sampaio, 2011). In particular, it has been proposed that the different spontaneous curvature observed for SM and DPPC in lamellar phases induces a segregation of both lipids forming microdomains or lipid rafts (Bystrom and Lindblom, 2003; Lindblom et al., 2006).

The curvature of the contact region of SM with St-I in DPPC/SM bilayers likely differs from that of DPC micelles. Therefore, the high affinity of actinoporins for SM molecules could be related with SM microdomains formation (Macek et al., 1994; De Los Rios et al., 1998; Alvarez-Valcarcel et al., 2001; Barlic et al., 2004). Figure 3a shows the St-I with unfolded N-terminal segment on the DPPC/SM membrane surface. The interaction of aromatic cluster (in green) with a SM microdomain can be observed.

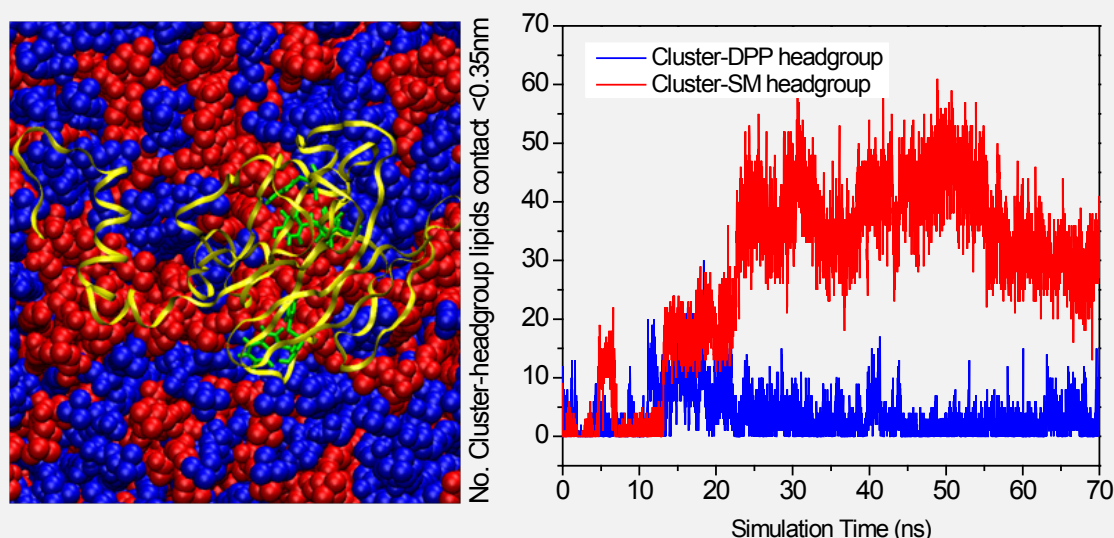


Figure 3. *a)* Representation of a lipidic system with St-I unfolded N-terminal segment at 60 ns of simulation (viewed from bilayer's normal). The aromatic cluster, represented in stick (green) is oriented toward membrane surface. DPPC (blue) and SM (red) are both represented in van der Waals' spheres. *b)* Number of contacts (<0,35nm) as a function of time between lipid headgroups and the St-I aromatic cluster.

To evaluate the association of the St-I to the membrane phospholipids, the interatomic contacts defined as interactions below 0.35 nm were calculated. Figure 3b shows the number of contacts of St-I aromatic cluster with DPPC and SM headgroups (choline-phosphate-glycerol and choline-phosphate-ceramide, respectively), as a function of simulation time. It is possible to observe a larger number of contacts for toxin-SM lipids than toxin-DPPC lipids. The minimum distance between phosphate-choline segments of lipids and the residues at the lipid binding-site is shown in figure 4. The interaction distances between SM-headgroup and aromatic cluster become closer than those observed with DPPC-headgroup. The W111, Y132 and Y137 residues are anchored at the membrane surface by interaction with SM headgroup. This is consistent with previous reports (Lanio et al., 2001; Bonev et al., 2003; Anderluh et al., 2005; Castrillo et al., 2010).

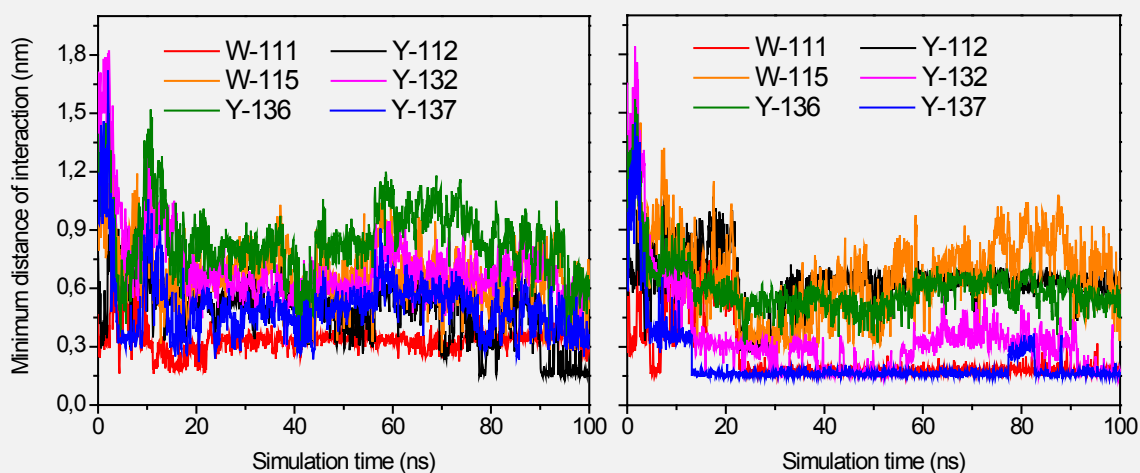


Figure 4. Plot of minimum distance between DPPC-headgroup (left) and SM-headgroup (right) and the binding-site residues, as a function of simulation time.

To study the nature of specific interaction between lipids and St-I, the minimum distance interaction of sub-phosphocholine region of lipids with the residues anchored were calculated. Figure 5 shows the minimum distance of interaction between ester group in DPPC and amide in SM with tryptophan 111. It is possible to observe that the amide group is closer to W-111 residue than ester group. This result can explain the preferential association of St-I to SM due to amide- π interaction. As has been described by experimental (Tsuzuki et al., 2000) and theoretical (Ottiger et al., 2009; Imai et al., 2009) studies, the amide- π interaction reveals stabilization energies from $-3.75 \text{ kcal mol}^{-1}$ to $-2.08 \text{ kcal mol}^{-1}$ with interactions distance ca. 0.36 nm , what is in agree with the obtained results.

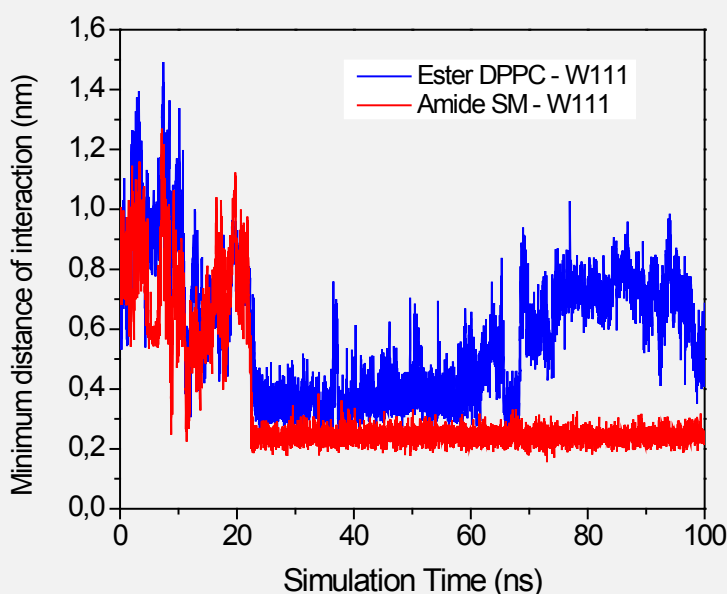


Figure 5.Plot of the minimum distance between tryptophan 111 and ester group in DPP (blue) and between tryptophan 111 and amide group in SPM as a function of time.

The structure of N-terminal segment of St-I was studied by analysis of time-dependent secondary structure of the first 30 residues of the toxin.DSSP plot (fig. 6) shows a stable α -helix for the residues 14-28from 40 ns. These results are in agreement with the estimated helix population proposed by Castrillo and co-workers(Castrillo at al., 2010) for the residues 14-24 in St-I (1-30 peptide), and 16-26 for Eq-II (1-32 peptide) (Dreschler et al., 2006). The residues 1-13 appear more unstructured in comparison with St-II (Casallanovo et al., 2006) and Eq-II (Lam et al., 2010).The presence of the S-1 polar residue and two anionic E-2 and D-9 residues,instead the A-1 and A8 hydrophobic residues in St-II, could contribute to the destabilization of the helical structure of St-I. As has been described, a stabilized amphipatic τ -helix in a lipid environment would be necessary to associate deeply in the membrane (Hong et al., 2002; Malovrh et al., 2003; Kristan et al., 2009). This would explain the difference, observed by Huerta and co-workers(Huerta et al., 2001), in the hemolytic activity shown for the sticholysins.

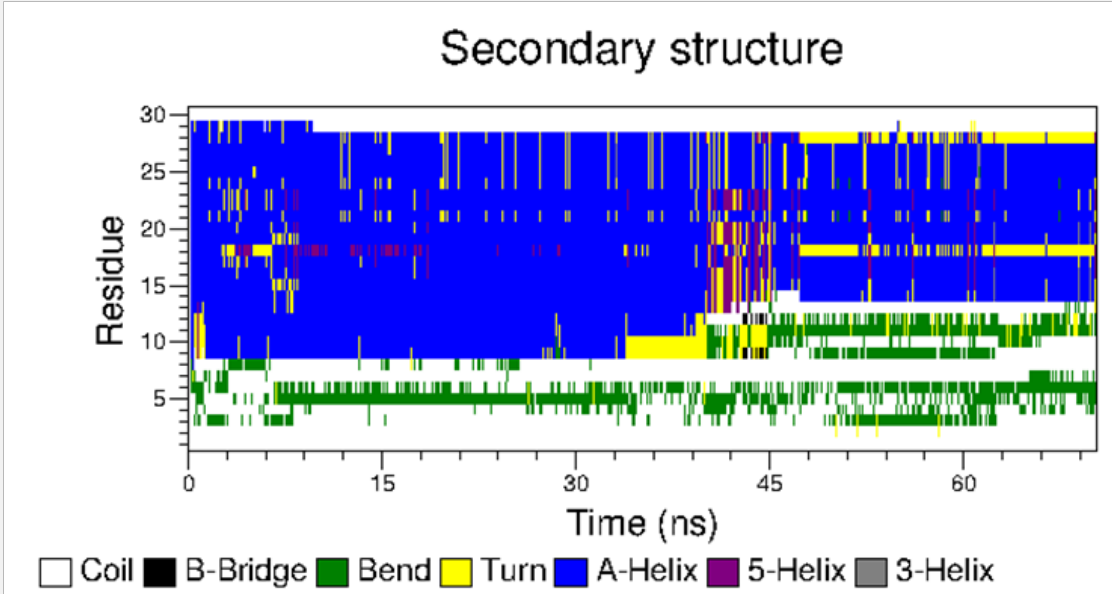


Figure 6.Secondary structure representation as a function of time. The secondary structure is differentiated by color as defined in the figure.

To analyze the kind of interactions implicated in the recognition by the membrane and the interaction with the N-terminal segment, the contributions of the different interactions to the energy are shown in figure 7.

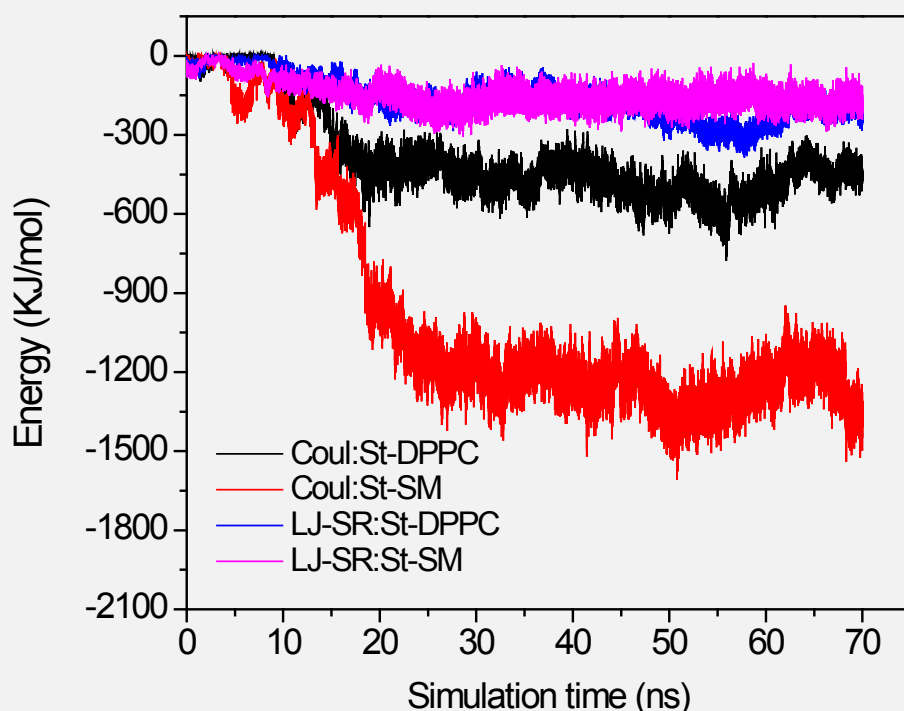


Figure 7. *Plot of the coulombic and short-range Lennard-Jones interactions as a function of time.*

The van der Waals interactions, represented by Lennard-Jones potential, contribute in low proportion to the stabilization energy of the system compared with the electrostatic interactions represented by Coulomb potential. The coulombic and short-range (SR) Lennard-Jones interactions are a qualitative estimation of toxin-lipid interaction. The energy of coulombic interactions indicates that electrostatic interaction is the main force that drives the process of recognition and binding of the toxin to the membrane.

CONCLUSION

In conclusion, the simulation presented in this work provides a good model for St-I interacting with a DPPC/SM bilayer. The amide- π interaction could explain the preferential association between actinoporins and SM. Furthermore, the present simulation allows establishing the forces that drive the first steps of the complex pore formation process.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are given to Fondecyt grant No. 11085049 for financial support.

REFERENCES

- Alegre-Cebollada J., Oñaderra, M, Gavilanes JG & Martínez-del-Pozo AM., 2007. Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8, 558-572.
- Alegre-Cebollada J, Martinez Del Pozo A, Gavilanes JG., Goormaghtigh, E., 2007. Infrared spectroscopy study on the conformational changes leading to pore formation of the toxin sticholysin II. *Biophys. J.* 93, 3191-3201.
- Alegre-Cebollada J, Cunietti M, Herrero-Galán E, Gavilanes JG & Martínez-del- Pozo A., 2008. Calorimetric scrutiny of lipid binding by sticholysin II toxin mutants. *J. Mol. Biol.* 382, 920-930.
- Alvarez-Valcarcel, C., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M.E., Menestrina, G., 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by Sticholysin I and II, two cytolysins from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 80, 2761-2774.
- Alvarez, C., Casallanovo, F., Shida, C.S., Nogueira, L.V., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Menestrina, G., Lissi, E., Schreier, S., 2003. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces—Modulation of conformation, activity, and lipid-protein interaction. *Chem. Phys. Lipids* 122 (1-2), 97-105.

- Alvarez, C., Mancheno, JM., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, ME., 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon*, 54, 1135-1147.
- Anderluh, G., Barlic, A., Potrich, C., Macek, P., Menestrina, G., 2000. Lysine⁷⁷ is a key residue in aggregation of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *J. Membr. Biol.* 173, 47–55.
- Anderluh, G., Razpotnik, A., Podlessek, Z., 2005. Interaction of the eukaryotic pore-forming cytotoxin equinatoxin II with model membranes: ¹⁹F NMR studies. *J. Mol. Biol.* 347, 27-39.
- Athanasiadis, A., Anderluh, G., Macek, P., Turk, D., 2001. Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure* 9, 341–346.
- Barlic, A., Gutierrez-Aguirre, I., Caaveiro, JM., Cruz, A., Ruiz-Arguello, MB., Perez-Gil, J., Gonzalez-Manas, JM., 2004. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*, *J. Biol. Chem.* 279, 34209–34216.
- Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P., Menestrina, G., 1993. Pore formation by the sea anemone cytotoxin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membr. Biol.* 131, 11–22.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., Hermans, J., 1981. *Intermolecular Forces*. Pullman (Eds). D. Reidel Publishing Company, pp.331.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. J., 1984. Molecular-Dynamics with coupling to an external bath. *Chem. Phys.* 81, 3684-3690.
- Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D., van Drunen, R., 1995. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Phys. Communications* 91, 43-56.

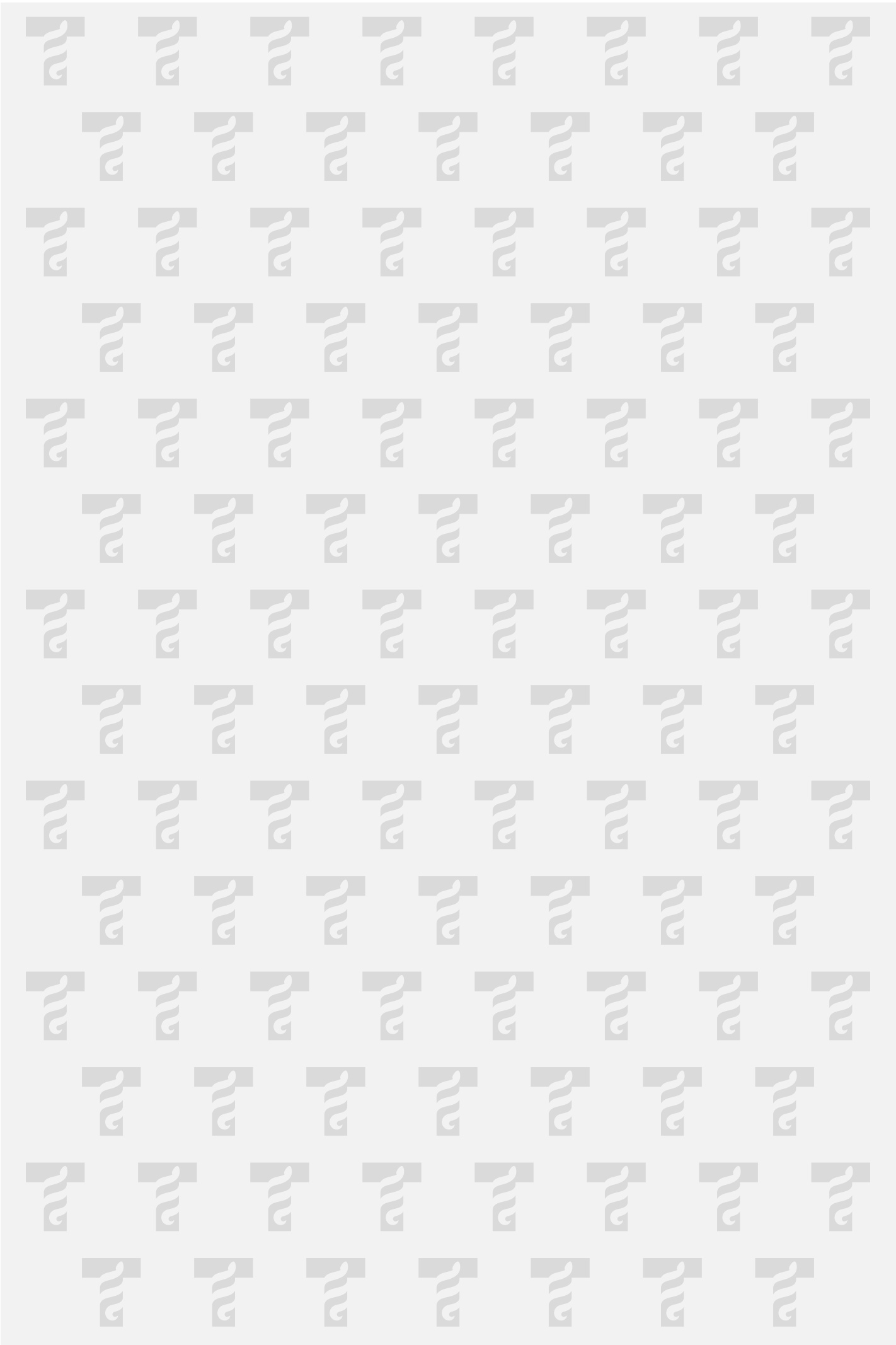
- Berger, O., Edholm, O., Jahnig, F., 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72, 2002-2013.
- Bonev, B.B., Lam, Y.H., Anderluh, G., Watts, A., Norton, R.S., Separovic, F., 2003. Effects of the eukaryotic pore-forming cytolytic Equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. *Biophys. J.* 84, 2382-2392.
- Brown DA, London E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14, 111-136.
- Byström, T., Lindblom, G., 2003. Molecular packing in sphingomyelin bilayers and sphingomyelin/phospholipid mixtures. *Spectrochim. Acta A*, 59, 2191-2195.
- Casallanovo, F., de Oliveira, F.J.F., de Souza, F.C., Ros, U., Martínez, Y., Pentón, D., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Pertinhez, T.A., Spisni, A., Cilli, E.M., Lanio, M.E., Alvarez, C., Schreier, S., 2006. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. *Biopolymers* 84 (2), 169-180.
- Castrillo, I., Alegre-Cebollada, J., del Pozo, A.M., Gavilanes, J.G., Santoro, J., Bruix, M., 2009. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments of StnII-R29Q, a defective lipid binding mutant of the sea anemone actinoporin Sticholysin II. *Biomol.Nmr Assign.* 3, 5-7.
- Castrillo, I., Araujo, N.A., Alegre-Cebollada, J., Gavilanes, J.G., Martínez-del-Pozo A., Bruix, M., 2010. Specific interactions of sticholysin I with model membranes: an NMR study. *Proteins* 78, 1959-1970.
- Darden, T., York, D., Pedersen, L., 1993. Particle mesh Ewald: An N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98, 10089-10092.
- De Los Rios, V., Mancheño, J.M., Lanio, M.E., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G., 1998. Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.*, 252, 284-289.

- De los Rios, V., Mancheño, J.M., Martinez del Pozo, A., Alfonso, C., Rivas, G., Ònaderra, M., Gavilanes, J.G., 1999. Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, is a monomer-tetramer associating protein. *FEBS Lett.* 55, 27–30.
- Drechsler, A., Potrich, C., Sabo, J.K., Frisanco, M., Guella, G., Dalla Serra, M., Anderluh, G., Separovic, F., Norton, R.S., 2006. Structure and activity of the N-terminal region of the eukaryotic cytolysin equinatoxin II. *Biochemistry* 45, 1818–1828.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Fraaije, J.G.E.M., 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18, 1463–1472.
- Hong, Q., Gutierrez-Aguirre, I., Barlic, A., Malovrh, P., Kristan, K., Podlesek, Z., Macek, P., Turk, D., González-Mañas, J.M., Lakey, J.H., Anderluh, G., 2002. Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J. Biol. Chem.* 277, 41916–41924.
- Huerta, V., Morera, V., Guanche, Y., China, G., González, L.J., Betancourt, L., Martínez, D., Alvarez, C., Lanio, M.E., Besada, V., 2001. Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon* 39, 1253–1256.
- Imai, Y.N., Inoue, Y., Nakashimi, I., Kitaura, K., 2009. Amide- π interactions between formamide and benzene. *J. Comput. Chem.* 30, 2267–2276.
- Kem, W. R. and Dunn, B. M. 1988. Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon*, 26, 997–1008.
- Kristan KC, Viero G, Dalla Serra M, Macek P & Anderluh G., 2009. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 54, 1125–1134.
- Lam YH, Hung A, Norton RS, Separovic F, Watts A., 2010. Solid-state NMR and simulation studies of equinatoxin II N-terminus interaction with lipid bilayers. *Proteins.* 78, 858–872.

- Lanio, M. E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gomez, T., Pazos, F., et al. 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 39, 187–194.
- Lindblom, G., Orädd, G., Filippov, A., 2006. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol: An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem. Phys. Lipids*. 141, 179–184.
- Macek, P. and Lebez, D. 1988. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon*, 26, 441–451.
- Macek, P., Belmonte, G., Pederzoli, C., Menestrina, G., 1994. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolysin from the sea anemone *Actinia equine* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology* 87, 205–227.
- Macek, P., Zecchini, M., Pederzoli, C., Dalla Serra, M., Menestrina, G., 1995. Intrinsic tryptophan fluorescence of equinatoxin II, a pore-forming polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L., monitors its interaction with lipid membranes. *Eur. J. Biochem.* 234, 329–335.
- Malovrh, P., Barlic, A., Podlessek, Z., Macek, P., Menestrina, G., Anderluh, G., 2000. Structure-function studies of tryptophan mutants of equinatoxinII, a sea anemone pore-forming protein. *Biochem. J.* 346, 223–232.
- Malovrh, P., Viero, G., Dalla Serra, M., Podlessek, Z., Lakey, J.H., Macek, P., Menestrina, G., Anderluh, G., 2003. A novel mechanism of pore formation. Membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J. Biol. Chem.* 278, 22678–22685.
- Mancheño, J.M., Martín-Benito, J., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G., Hermoso, J.A., 2003. Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11, 1319–1328.

- Martínez, D., Otero, A., Álvarez, C., Pazos, F., Tejuca, M., Lanio, M.E., Gutiérrez-Aguirre, I., Barlic, A., Iloro, I., Rodríguez, J.L., González-Mañas, J.M., Lissi, E., 2007. Effect of sphingomyelin and cholesterol in the interaction of St II lipidic interfaces. *Toxicon* 49, 68-81.
- Mechaly AE, Bellomio A, Gil-Carton D, Morante K, Valle M, González-Mañas, JM, Guerín DM., 2011. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure* 19, 181-191.
- Menestrina, G., Cabiaux, V., Tejuca, M., 1999. Secondary structure of sea anemone cytolysins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 174-180.
- Miyamoto, S., Kollman, P.A., 1992. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* 13, 952-962.
- Tejuca M, Dalla Serra M, Ferreras M, Lanio ME, Menestrina G., 1996. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35, 14947-14957.
- Niemelä, P., Hyvönen, MT., Vattulainen, I., 2004. Structure and Dynamics of Sphingomyelin Bilayer: Insight Gained through Systematic Comparison to Phosphatidylcholine. *Biophys. J.* 87, 2976-2989.
- Ottiger, P., Pfaffen, C., Leist, R., Leutwyler, S., Bachorz, RA., Kloppe, W., 2009. Strong N-H...pi hydrogen bonding in amide-benzene interactions. *J. Phys. Chem. B.* 113, 2937-2943.
- Ryckaert, J.P., Bellemans, A., 1978. Molecular dynamics of liquid alkanes. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 66, 95-106.
- Simons K, Ikonen E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- Simons K, Sampaio, JL., 2011. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004697.

- Tieleman, D. P., Berendsen, H. J. C., 1996. Molecular dynamicssimulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayerwith different macroscopic boundary conditions and parameters. J. Chem. Phys. 105, 4871–4880.
- Tsuzuki, S., Honda, K, Uchimaru, T., Mikami, M., Tanabe, K., 2000. Origin of the attraction and directionality of the NH/pi interaction: Comparison with OH/pi and CH/pi interactions. J. Am. Chem. Soc. 122, 11450-11458.
- Vangunsteren, W.F., Berendsen, H.J.C., 1990.Computer Simulation of Molecular Dynamics:Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29, 992-1023.



CALTX A NEW TOXIN (13 AMINO ACID RESIDUES) BLOCKER OF CALCIUM CHANNELS OBTAINED FROM *Conus Californicus*

Emilio Salceda^a, Omar López^a and Enrique Soto^{a*}

^aInstituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México 14 sur 6301, CU, San Manuel, Puebla, Pue. CP 72570, México

*a-mail: esoto2424@yahoo.com

ABSTRACT

We previously demonstrated that fraction 13 from the venom of *Conus californicus* partially blocks calcium currents I_{Ca} from rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. CalTx sequence (NCPAGCRSQGCCM) is strikingly different from ω -conotoxins, making it a novel calcium conotoxin. To further characterize the effect of CalTx action upon the Ca²⁺ current and to define its selectivity among Ca²⁺ current subtypes, we studied the Ca²⁺ current using the voltage clamp technique in rat DRG neurons.

The effect of CalTx on I_{Ca} was concentration-dependent (IC₅₀ = 4.96 ± 2 μ M, Hill slope = 1.6 ± 3 , N = 36). LVA currents were not affected by CalTx while HVA currents were inhibited by 10 μ M CalTx. 3 μ M nifedipine (L-type selective blocker) reduced the peak Ca²⁺ current $30 \pm 12\%$ (N = 6) (P < 0.05); 10 μ M CalTx reduced the peak calcium current $36 \pm 5\%$ (n = 7) (P < 0.05). In the presence of 3 μ M nifedipine application of 10 μ M CalTx (N=6) produced an additional block of 5% (attaining a total of $36 \pm 7\%$ block) indicating that preapplication of nifedipine occluded 83% of the CalTx effect. 1 μ M ω -conotoxin MVIIA (N-Type selective blocker) reduced the peak Ca²⁺ current in $46 \pm 9\%$ (N=13) (P < 0.05). The application of 10 μ M CalTx (N=6) in the presence of the ω -MVIIA produced an additional block of 8% attaining a total block of $54 \pm 9\%$ respect to the control.

We conclude that the action of CalTx is non-selective among the HVA Ca^{2+} currents.

KEY WORDS: Voltage-gated calcium channels, conotoxins, *Conus californicus*

RESUMEN

Previamente demostramos que la fracción 13 del veneno de *Conus californicus* bloquea parcialmente las corrientes de calcio (ICa) de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) de rata. La secuencia de CalTx (NCPAGCRSQGCCM) es notoriamente distinta de la de las ω -conotoxinas, representando una nueva familia de conotoxinas. En este trabajo profundizamos en la caracterización funcional de CalTx e intentamos definir su selectividad empleando la técnica de fijación de voltaje.

El efecto de CalTx sobre ICa fue dependiente de la concentración ($\text{IC}_{50} = 4.96 \pm 2 \mu\text{M}$, pendiente = 1.6 ± 3 , $N = 36$). Las corrientes LVA no fueron afectadas por CalTx, mientras que las HVA fueron inhibidas por CalTx $10 \mu\text{M}$. Nifedipina $3 \mu\text{M}$ (bloqueador de corrientes tipo L) redujo el pico de ICa $30 \pm 12\%$ ($N = 6$) ($P < 0.05$); CalTx $10 \mu\text{M}$ redujo la corriente al pico $36 \pm 5\%$ ($n = 7$) ($P < 0.05$). En presencia de nifedipina $3 \mu\text{M}$ la aplicación de CalTx $10 \mu\text{M}$ ($N=6$) produjo un bloqueo adicional del 5% (para un bloqueo total de $36 \pm 7\%$) y por tanto la preaplicación de nifedipina ocluyó en 83% el efecto de CalTx. La aplicación de ω -conotoxina MVIIA $1 \mu\text{M}$ (bloqueador de corrientes tipo N) redujo el pico de corriente en $46 \pm 9\%$ ($N=13$) ($P < 0.05$). CalTx $10 \mu\text{M}$ ($N=6$) en presencia de ω -MVIIA produjo un bloqueo adicional de 8%, alcanzándose un bloqueo total de $54 \pm 9\%$ respecto al control.

Concluimos que la acción de CalTx no es selectiva entre corrientes HVA.

PALABRAS CLAVES: de calcio dependientes de voltaje, conotoxinas, *Conus californicus*

INTRODUCTION

The genus *Conus* comprehend 700 venomous species, each one expressing between 100 and 200 venom peptides. *C. californicus* has been shown to be distantly related to all *Conus* species showing unusual biological features.

We previously demonstrated that fraction 13 (CalTx, Bernaldez et al., 2011) from the venom of *Conus californicus* partially blocks total calcium currents from rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. CalTx sequence (NCPAGCRSQGCCM) is strikingly different from regular ω -conotoxins, making it a novel calcium conotoxin. Here we characterize the effect of synthetic CalTx (sCalTx) action upon the Ba²⁺ current (IBa) in DRG neurons and to define its potential selectivity among Ba²⁺ current subtypes, we studied the Ba²⁺ current using the whole cell voltage clamp technique in DRG neurons.

MATERIALS AND METHODS

Primary cultured dorsal-root ganglion (DRG) neurons of Wistar rats (P7-10) were used for whole cell voltage clamp experiments. To isolate the barium current the pipette solution contained (mM): 140 CsCl, 5 TEA-Cl, 5 HEPES, 10 EGTA, 2 Mg-ATP, 1 Na-GTP (pH 7.2). The extracellular solution contained (mM): 10 BaCl₂, 5 CsCl, 1.2 MgCl₂, 125 TEA-Cl, 10 4-AP, and 10 HEPES (pH7.4). A detailed description of the methodology can be found in Bernaldez et al., 2011.

RESULTS

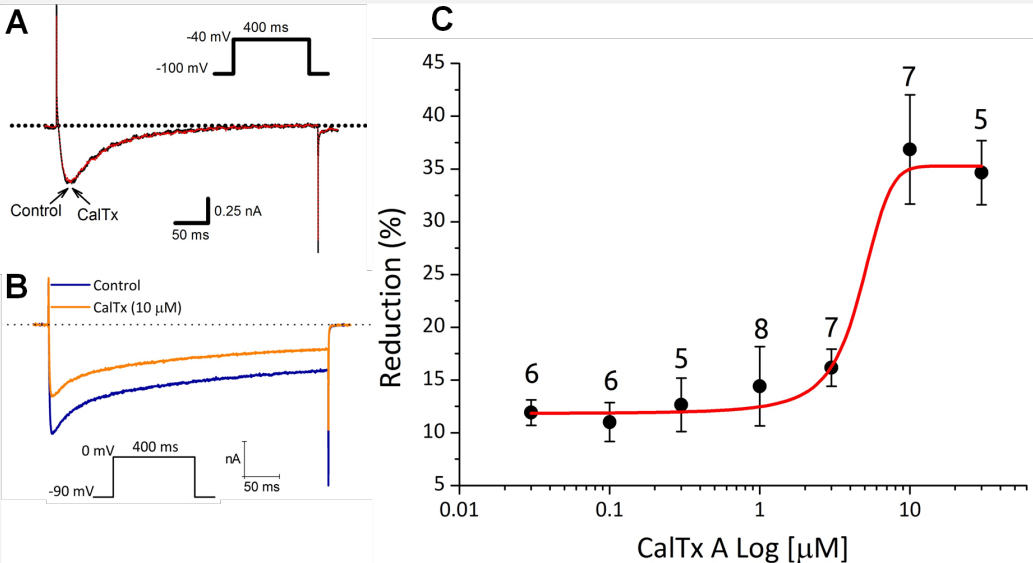


Figure 1. Effects of sCalTx on LVA and HVA barium currents. A, LVA Ba^{2+} current in control (black) and after sCalTx ($10\ \mu\text{M}$) ($n = 3$) perfusion (red); there was no change in the LVA current. Inset, voltage protocol to activate LVA currents. B, the use of sCalTx ($10\ \mu\text{M}$) inhibited the HVA- Ca^{2+} current 34% in the case shown, inset, voltage protocol. C, Dose response curve of sCalTx on Ba^{2+} current, the number over each dot indicates the N. Adjusting a dose-response equation gave an IC_{50} of $4.6\ \mu\text{M}$, with a Hill number of 0.5. Only the effect with 10 and $30\ \mu\text{M}$, were significant with $P < 0.05$, paired Student's t-test.

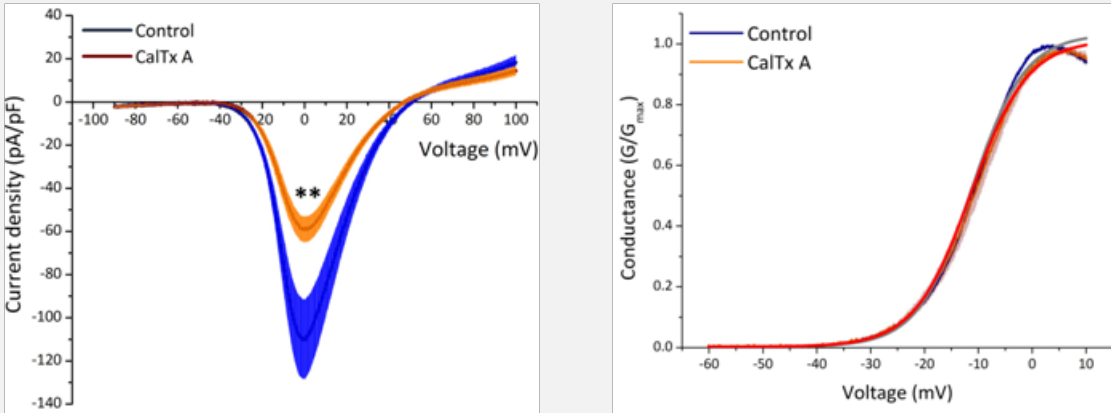


Figure 2. Effects of sCalTx on the current density versus voltage and conductance curves. Left, using a ramp protocol starting at $-90\ \text{mV}$ up to $100\ \text{mV}$ with a duration of $100\ \text{ms}$, we construct the current density versus voltage curve ($N=7$); in blue, the control curve; in orange, the curve in the presence of sCalTx $10\ \mu\text{M}$. Shadows in the same colors represent the SEM. There were no changes in the activation voltage nor in the reverse potential of the current, the effect on the current was maximum at $0\ \text{mV}$ ($P<0.01$). Right, conductance curve of IBa (blue) did not change after the application of sCalTx ($10\ \mu\text{M}$) (red); adjusting a Boltzman equation (control in gray, sCalTx in red) were obtained the parameters of $V_{1/2}$: control = $-11.3\ \text{mV}$, sCalTx = $-11.4\ \text{mV}$; k : control = 4.9 , sCalTx = 5 . $N = 7$.

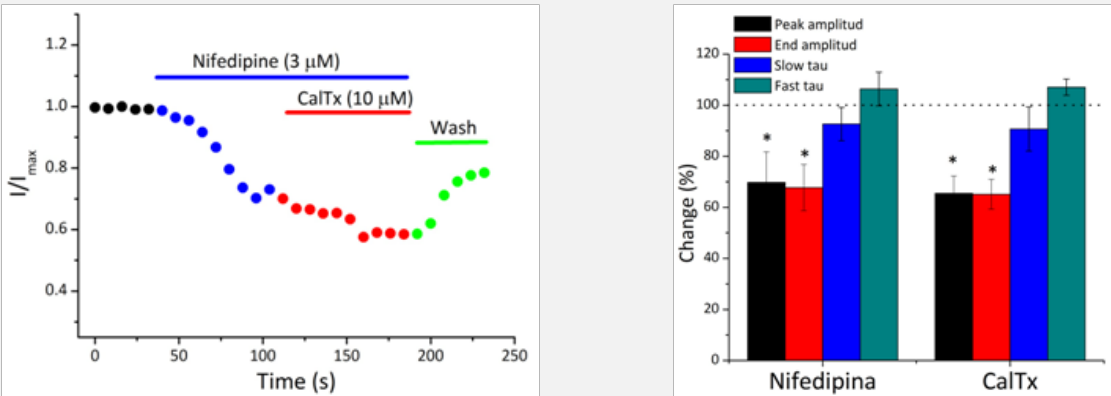


Figure 3. Action of sCalTx on the IBa in the presence of nifedipine.

Left, temporal course of the application of nifedipine, sCalTx and wash; the recovery of the current was not complete after 3 min of wash. B, bar graph showing the effect of nifedipine and nifedipine + sCalTx, on four parameters. The use of 3 μM nifedipine (L-type selective blocker) significantly reduced the peak Ba^{2+} current $30 \pm 12\%$ ($N = 6$) ($P < 0.05$), while 10 μM sCalTx reduced the peak barium current $36 \pm 5\%$ ($n = 7$) ($P < 0.05$). In the presence of 3 μM nifedipine application of 10 μM CalTx ($N=6$) produced an additional block of 5% (attaining a total of $36 \pm 7\%$ block) thus indicating that preapplication of nifedipine occluded 83% of the CalTx effect. There were no changes in neither slow or fast tau.

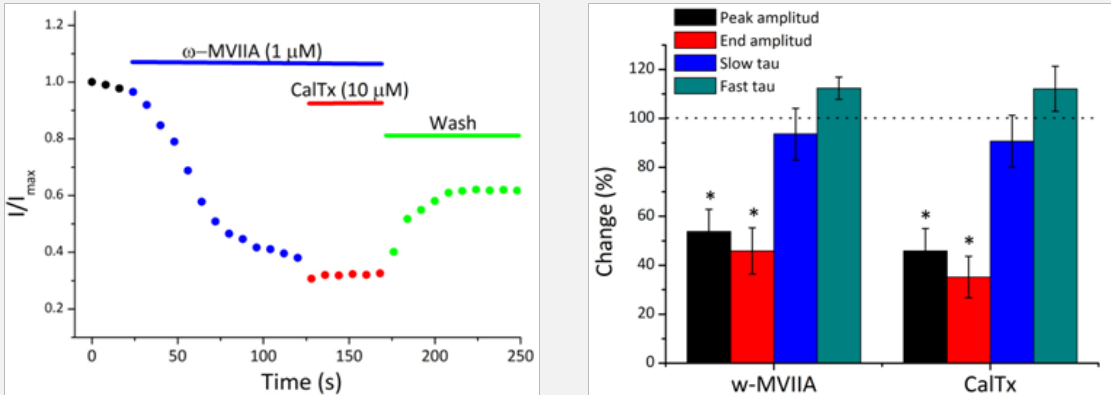


Figure 4. Left, temporal course of the application of ω -MVIIA (1 μM), sCalTx (10 μM) and wash; it was observed only a partial recovery of the current after 5 min of wash. Right, bar graph showing the effect of ω -MVIIA and ω -MVIIA + sCalTx, on four parameters. The use of 1 μM ω -MVIIA (N-type selective blocker) significantly reduced the peak Ba^{2+} current $46.2 \pm 9\%$ ($n = 13$) ($P < 0.01$), while 10 μM sCalTx reduced the peak barium current $36 \pm 5\%$ ($n = 7$) ($P < 0.05$). In the presence of 1 μM ω -MVIIA application of 10 μM CalTx ($N=6$) produced an additional block of 8% (attaining a total of $54.1 \pm 9.1\%$ ($n = 6$) block). There were no changes in neither slow or fast tau.

DISCUSSION

CalTx is a low molecular-weight peptide formed by 13 amino acids, with 4 cysteines forming 2 disulfide bonds. The amino acid sequence of the peptide (NCPAGCRSQGCCM) was previously reported (Biggs et al., 2010). In contrast with CalTx, ω -conotoxins typically include peptides of 12–30 amino acids, with 6 cysteines forming a frame C–C–CC–C–C (framework VI/VII) that forms three disulfide bonds (Olivera et al., 1984; Lewis et al., 2000; Terlau and Olivera, 2004). A

similar, 13-amino acid toxin that blocks the presynaptic Ca^{2+} influx has been reported (ϵ -TxIX, isolated from *Conus textile*); however, the frame formed by the cysteines is different from CalTx (Rigby et al., 1999). CalTx has the framework XVI of the M-superfamily previously reported by Pi et al. (2006), however no previous reports of blocking activity on voltage-gated ionic channels has been reported for this family of peptides, and it has been proposed that *C. californicus* did not have toxins of the M-superfamily (Biggs et al., 2010).

In this work we dissected the two components (LVA and HVA) by means of a voltage protocol (Lewis et al., 2000; Scroggs and Fox, 1992). Our results showed a clear block of the HVA calcium currents by CalTx. The HVA currents correspond to L, N, P-Q, and R-type Ca^{2+} currents, all of which are present in dorsal-root ganglion neurons of the rat (Kostyuk et al., 1993; Yuaf et al., 2001). In contrast, there was no significant effect on the LVA current, corresponding to the T-type Ca^{2+} current. Our experiments show also that CalTx is not selective to the components L and N of the HVA Ca^{2+} current. Similar to other calcium-channel pore-blocking toxins (McDonough, 2007; McDonough et al., 2002; Ellinor et al., 1994; Lew et al., 1997), CalTx did not modify the voltage dependency of activation nor of the inactivation.

The ω -conotoxins family is 24–29 amino acids long (Table 1). They have in their structure three intramolecular disulfide bonds known as the four-loop Cys scaffold (Uchitel, 1997). A striking diversity of the amino acid sequence is a feature of ω -conotoxins, with the only common features of the sequences the six half-cysteine residues and the Gly at position 5 (Uchitel, 1997). CalTx has the cysteine framework C–C–CC reported for the M-superfamily of conopeptides (Pi et al., 2006) and, interestingly, exhibits a Gly residue at position 5. However, its belonging to a superfamily remains to be defined since the corresponding signal peptide has not been identified.

Given the number of amino acids and the framework of Cys-paired, CalTx is a novel *Conus* calcium channel toxin and may be a member of a new family of Ca^{2+} -blocking peptides.

PÉPTIDE	CONUS SPECIES	SEQUENCE
ω-Conotoxina GVIA	<i>C. geographus</i>	CKSOGSSCSOTSYNCCRSCNOYTKRCY*
ω-Conotoxina MVIIA	<i>C. magus</i>	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK*
ω-Conotoxina MVIIIC	<i>C. magus</i>	CKGKGAPCRKTMYDCCSGSCGRRGKC*
ω-Conotoxina CVID	<i>C. catus</i>	CKSKGAKCSKLMYDCCTGSCSGTVGTC*

CONCLUSIONS

Our results shown that sCalTx, a low molecular weight 13 amino acids peptide, blocked IBa in DRG neurons of the rat. sCalTx did not affect LVA currents. It has a significant effect over HVA current with a IC50 of 4.6 μM; sCalTx did not modified the activation parameters nor the reverse potential of the current. So far the results show that sCalTx is no selective among HVA calcium channels subtypes, since it has effect over the L-type current (nifedipine blocked) and over N-type current (ω-MVIIA blocked). Further experiments are necessary to determine the effects of CalTx on P/Q and R calcium channel subtypes.

ACKNOWLEDGEMENTS

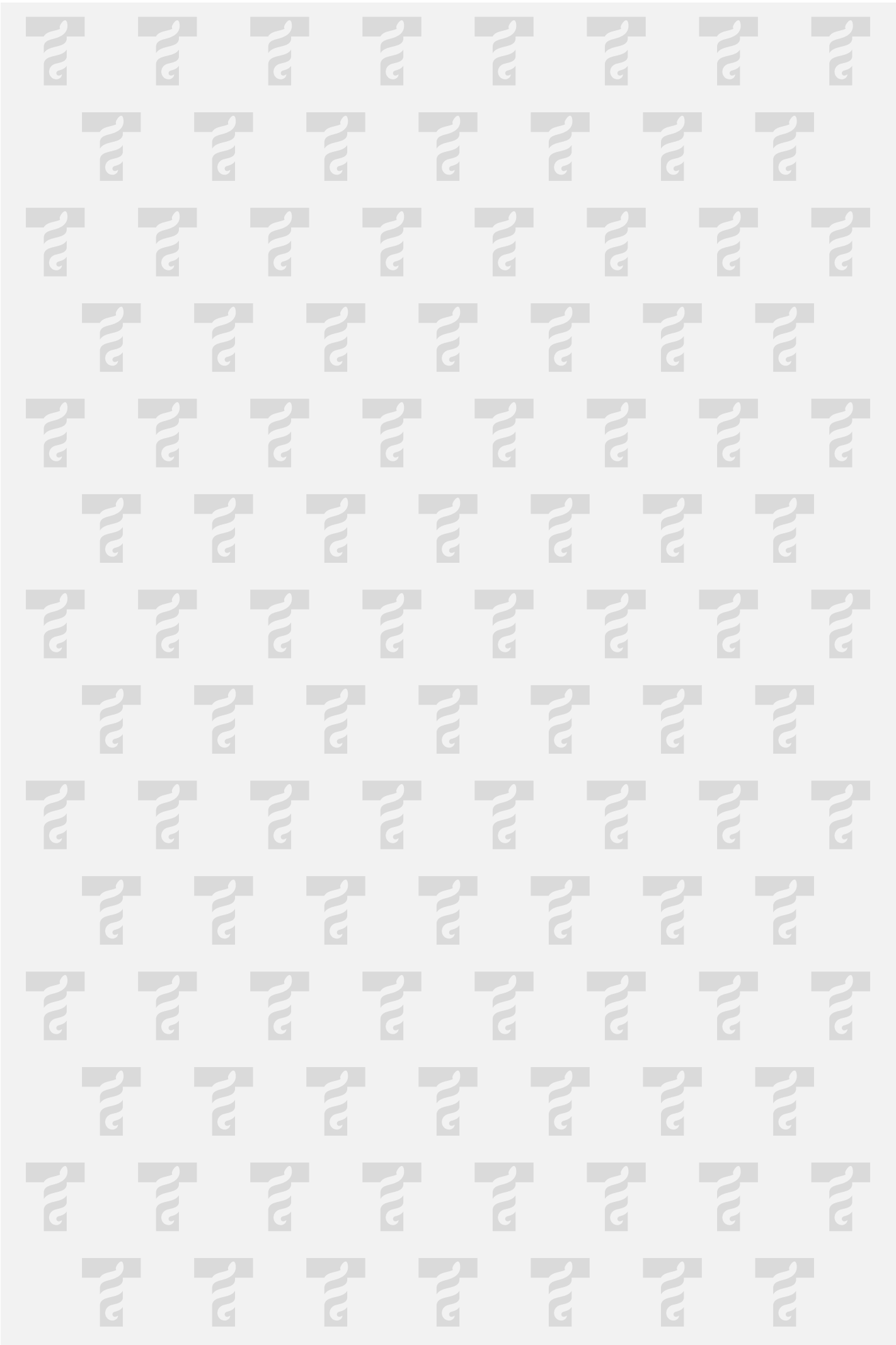
This work was partially supported by VIEP-BUAP, grant 2012. OLR was supported by CONACyT fellowship 175945.

REFERENCES

- Bernaldez, J., López, O., Licea, A., Salceda, E., Arellano, R., Vega, R., Soto, E., 2011. Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca2+ channels. *Toxicology* 57, 60–67.
- Biggs, J.S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K.J., Navarro, A.L., Corneli, P.S., Olivera, B.M., 2010. Evolution of *Conus* peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 1–12.
- Ellinor, P.T., Zhang, J.-F., Horne, W.A., Tsien, R.W., 1994. Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 372, 272–275.
- Kostyuk, P., Pronchuk, N., Savchenko, A., Verkhratsky, A., 1993.

- Calcium currents in aged rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* 461, 467–483.
- Lew, M.J., Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Murphy, R., Whorlow, S.L., Wright, C.E., Norton, R.S., Angus, J.A., 1997. Structure–function relationships of ω -conotoxin GVIA. *J. Biol. Chem.* 272, 12014–12023.
- Lewis, R.J., Nielsen, K.J., Craik, D.J., Loughnan, M.L., Adams, D.A., Sharpe, I. A., Luchian, T., Adams, D.J., Bond, T., Thomas, L., Jones, A., Matheson, J.L., Drinkwater, R., Andrews, P.R., Alewod, P.F., 2000. Novel ω -conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* 275, 35335–35344.
- McDonough, S.I., 2007. Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. *Toxicon* 49, 202–212.
- McDonough, S.I., Boland, L.M., Mintz, I.M., Bean, B.P., 2002. Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J. Gen. Physiol.* 119, 313–328.
- Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Luque, F.A., Gray, W.R., 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23, 5087–5090.
- Pi, C., Liu, J., Peng, C., Liu, Y., Jiang, X., Zhao, Y., Tang, S., Wang, L., Dong, M., Chen, S., Xu, A., 2006. Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics* 88, 809–819.
- Pi, C., Liu, J., Peng, C., Liu, Y., Jiang, X., Zhao, Y., Tang, S., Wang, L., Dong, M., Chen, S., Xu, A., 2006. Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics* 88, 809–819.
- Rigby, A.C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D.E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., et al., 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca^{2+} influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5758–5763.
- Scroggs, R.S., Fox, A.P., 1992. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Physiol.* 445, 639–658.

- Terlau, H., Olivera, B.M., 2004. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84, 41–68.
- Uchitel, O.D., 1997. Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon* 35, 1161–1191.
- Yua, S.P., Goodman, J., Pinnock, R.D., Dixon, A.K., Lee, K., 2001. Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 311, 137–141



LA THALASSIOLINA-B, UN FLAVONOIDE DE ORIGEN MARINO CON EFECTO ANTINOCICEPTIVO, BLOQUEA LA CORRIENTE ASIC EN LAS NEURONAS DE LOS GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL DE LA RATA

Enrique Soto^{a*}, Omar López^a, Emilio Salceda^a

^aInstituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México 14 sur 6301, CU, San Manuel, Puebla, Pue. CP 72570, México

*e-mail: esoto2424@yahoo.com

RESUMEN

Los canales sensibles a la concentración extracelular de protones (ASIC) tienen un papel significativo en la sensación de dolor y constituyen un blanco importante en la búsqueda de nuevas drogas antinociceptivas. En este trabajo estudiamos las propiedades antinociceptivas del extracto BM.21, obtenido del pasto marino *Thalassia testudinum*, y del principal componente fenólico aislado de este extracto, una flavona sulfatada llamada thalassiolina B, empleando modelos de nocicepción térmica y química en ratón. La acción de BM-21 y de thalassiolina B fue evaluada también en las corrientes ASIC de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) de ratas Wistar. Se realizaron experimentos conductuales en ratones OF-1. La administración por vía oral de dosis únicas de BM-21 produjo una inhibición significativa de la nocicepción química causada por ácido acético y formalina (específicamente durante su segunda fase), e incrementó el tiempo de reacción en la prueba de placa caliente. La thalassiolina B disminuyó la conducta de lamido durante las fases fásica y tónica en el test de formalina. Se encontró también que tanto BM-21 como thalassiolina B inhiben selectivamente las corrientes ASIC con desensibilización rápida ($\tau < 400$ ms) y no las corrientes con un curso temporal de desensibilización más lento. La acción de thalassiolina B no muestra dependencia del pH ni del voltaje, y tampoco es modificada por

la desensibilización de estado estacionario. La alta concentración de thalassiolina B en el extracto puede explicar la acción nociceptiva de BM-21.

PALABRAS CLAVES: *Thalassia testudinum*, ASICs, dolor, antinocicepción, flavonoide.

ABSTRACT

Acid-sensing ion channels (ASIC) have a significant role in the sensation of pain and constitute an important target for the search of new antinociceptive drugs. In this work we studied the antinociceptive properties of the BM-21 extract, obtained from the sea grass *Thalassia testudinum*, in chemical and thermal models of nociception in mice. The action of the BM-21 extract and the major phenolic component isolated from this extract, a sulphated flavone glycoside named thalassiolin B, was studied in the chemical nociception test and in the ASIC currents of the dorsal root ganglion (DRGs) neurons obtained from Wistar rats. Behavioral antinociceptive experiments were made on male OF-1 mice. Single oral administration of BM-21 produced a significant inhibition of chemical nociception caused by acetic acid and formalin (specifically during its second phase), and increased the reaction time in the hot plate test. Thalassiolin B reduced the licking behavior during both the phasic and tonic phases in the formalin test. It was also found that BM-21 and thalassiolin B selectively inhibited the fast desensitizing ($\tau < 400$ ms) ASIC currents in DRG neurons obtained from Wistar rats, with a nonsignificant action on ASIC currents with a slow desensitizing time-course. The action of thalassiolin B shows no pH or voltage dependence nor is it modified by steady-state ASIC desensitization or voltage. The high concentration of thalassiolin B in the extract may account for the antinociceptive action of BM-21.

KEY WORDS: *Thalassia testudinum*, ASICs, pain, antinociception, flavonoid.

INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones (ASIC, por sus siglas en inglés: Acid Sensing Ion Channels) constituyen un grupo de canales iónicos selectivos al sodio y activados por acidosis extracelular. Son ampliamente expresados en neuronas tanto del sistema nervioso central, como del periférico (Krishtal, 2003; Wemmie et al., 2006; Lingueglia, 2007). La participación de los ASIC en los procesos sensoriales, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, y en la supervivencia de las neuronas después de la isquemia global en el cerebro se ha demostrado en varios modelos animales (Wemmie et al., 2002; Lingueglia, 2007; Mercado et al., 2005; Vega et al., 2009).

El papel de los ASIC en la nocicepción se ha demostrado en diferentes modelos de dolor e hiperalgesia inflamatoria (Devalet et al., 2008). El dolor cutáneo producido en los seres humanos por pH moderado (hasta 6) es en gran parte mediado por los ASIC (Jones et al., 2004). La sensación de dolor producida por la isquemia cardiaca también parece estar mediada por la activación ASIC (Yagi et al., 2006).

La búsqueda de nuevos agentes farmacológicos selectivos sin efectos secundarios significativos es un requisito creciente para el desarrollo de fármacos enfocados al tratamiento del dolor agudo y crónico. El extracto estandarizado llamado BM-21 obtenido del pasto marino *Thalassia testudinum*, una planta marina muy abundante en las costas de Cuba, es un producto rico en flavonoides y no posee ninguna toxicidad conocida, pero tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y contribuye a la recuperación de la dermis dañada por irradiación (Nuñez et al., 2006). El fraccionamiento de BM-21 guiado por bioensayo dio como resultado el aislamiento de thalassiolina B (chrysoeriol 7- β -D-glucopiranosil-2"-sulfato), el componente más abundante del extracto.

En este trabajo se describen los efectos antinociceptivos de BM-21 y thalassiolina B en diferentes modelos animales de dolor, así como la acción inhibitoria de BM-21 y thalassiolina B en las corrientes ASIC en neuronas aisladas de los ganglios de la raíz dorsal en cultivo primario.

MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción y el aislamiento de BM-21 y Thalassiolina B fueron realizados en el Centro de Bioactivos Marinos de La Habana, Cuba. Los experimentos in vivo se realizaron en ratones machos adultos (25-30 g) adaptados a las condiciones del laboratorio desde al menos una semana antes de realizar los experimentos, en condiciones estándar de iluminación, humedad y acceso a alimento y agua. Un día antes del experimento, fueron trasladados a una habitación silenciosa y fueron privados de alimento y agua dos horas antes del experimento.

Para estudiar la actividad antinociceptiva de BM-21, los siguientes grupos y protocolos de tratamiento fueron empleados: grupo 1 (control), los ratones fueron tratados con agua destilada; grupos 2, 3, 4, 5 y 6 los ratones fueron tratados con BM-21 (4, 20, 40, 400 y 1000 mg*kg⁻¹); grupo 7, los animales fueron tratados con indometacina 15 mg*kg⁻¹. Otra serie experimental incluyó el estudio de los efectos de amilorida 100 mmol*kg⁻¹ y thalassiolina B 100 mmol*kg⁻¹ en la prueba de la formalina. Cada animal fue utilizado una vez. La administración de los vehículos utilizados para disolver las sustancias no presentó una acción significativa en las pruebas conductuales. Los modelos empleados para la evaluación de la actividad antinociceptiva fueron la prueba de placa caliente, la inyección intraperitoneal de ácido acético y la prueba de la formalina; la actividad motora fue evaluada empleando un aparato rota-rod. Los detalles del diseño experimental pueden consultarse en Garateix y colaboradores (2011). El análisis estadístico se realizó empleando la prueba ANOVA y las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

Para estudiar el efecto de BM-21 y de thalassiolina B sobre las corrientes ASIC, se utilizó la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa. Para este fin, se utilizaron las neuronas de DRG de ratas Wistar (P5 y P9), aisladas y cultivadas de acuerdo con el procedimiento descrito por Salceda y colaboradores (2002). Las soluciones empleadas fueron: a) extracelular (en mM): KCl 5.4, NaCl 140, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.8,

capsazepina 10, HEPES o MES 10, Glucosa 10, ajustada al pH con NaOH. Para aquellas soluciones con pH inferior a 6.1 se empleó MES en vez de HEPES como amortiguador; b) intracelular (en mM): KCl 125, NaCl 10, CaCl₂ 0.1, HEPES 10, EGTA 10, GTPNa 1, ATPMg 2. pH 7.2 ajustado con KOH. Los cambios de solución (< 100 ms) se realizaron por medio de un sistema SB-77 de perfusión controlado por computadora (Warner Instruments). El control experimental y el registro de las corrientes se efectuó usando el programa Pclamp 9 (Molecular Devices.). Las corrientes provocadas por ácido fueron generadas al perfundir la célula en registro con solución ácida. El BM-21 fue coaplicado con el cambio de pH a 6,1, mientras que lathalassiolinaB fue preaplicada 20 segundos antes del pulso de pH a 6,1, y durante toda la duración del mismo (5 segundos). Para comparar datos en la misma célula se empleó la prueba t de Student pareada.

RESULTADOS

Efectos del BM-21 y thalassiolinaB in vivo

Pruebas de placa caliente e inyección de ácido acético

La administración de BM-21 (4 y 20 mg*kg⁻¹, n = 6 cada uno) no produjo un efecto significativo. Sin embargo, BM-21 (40, 100, 400, y 1000 mg*kg⁻¹, n = 12 cada uno) e indometacina (15 mg*kg⁻¹, n = 16) produjeron un aumento significativo de la latencia de la respuesta 90 minutos después de su administración (P < 0.05). La inyección intraperitoneal de ácido acético en ratones control produjo 51.4 ± 4.1 contorsiones y estiramientos (n = 19).

BM-21 (40 mg*kg⁻¹) redujo significativamente el número de contorsiones y estiramientos a 26.8 ± 5.7 (47% de protección, n = 12, p = 0.018); la reducción máxima del número de contorsiones y estiramientos se observó con una dosis de 400 mg*kg⁻¹ (21.9 ± 3.9, 57% de protección, n = 19, P < 0.001) Ver Figura 1.

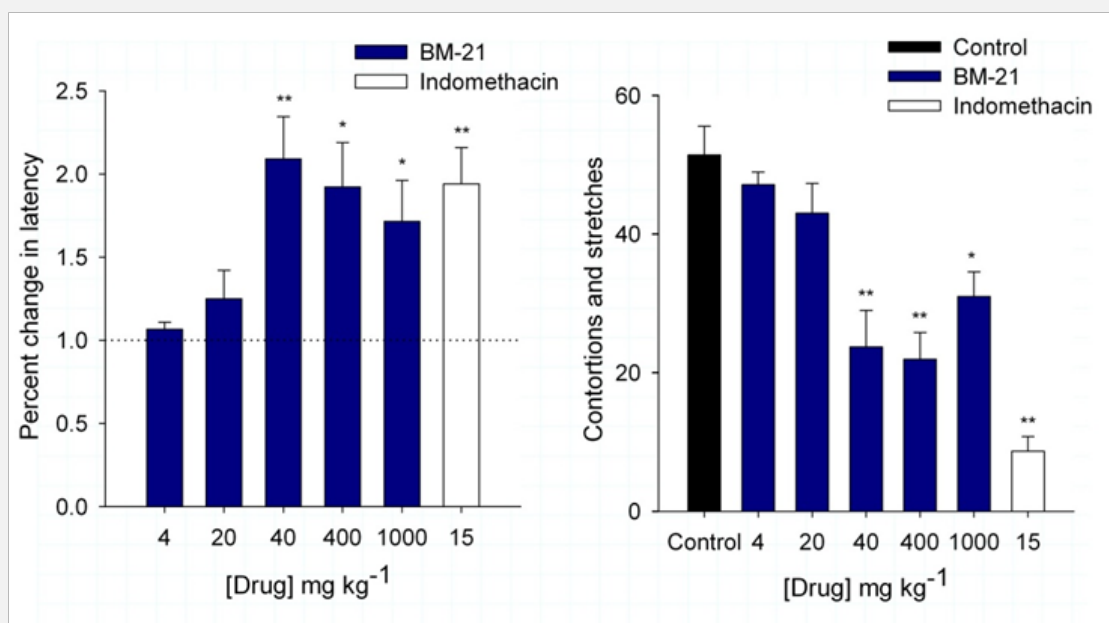


Figura 1. Efectos de BM-21 sobre la nocicepción térmica y en la prueba de inyección de ácido acético. A) En la prueba de la placa caliente el uso de BM-21 (40-1000 mg*kg⁻¹) y de indometacina (15 mg*kg⁻¹) incrementó la latencia de respuesta 90 minutos después de la administración del fármaco: control = 3.3 s (línea punteada). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$. En esta y las siguientes gráficas, cada barra representa la media \pm SE; * y ** indican diferencias significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$, $P \leq 0.001$, ANOVA de una vía y t de Student). **B)** El número de contorsiones y estiramientos generados por la inyección intraperitoneal de ácido acético medidos en condiciones control y 90 min después de la administración de BM-21 o indometacina.

Prueba de nocicepción por formalina

BM-21 ($n = 12$ para cada grupo) no ejerció ningún efecto significativo sobre el número de lamidos en la primera fase (0-5 min) después de la inyección de formalina. Sin embargo, en la segunda fase (15-30 min), BM-21 produjo un efecto significativo a concentraciones entre de 20 y 1000 mg*kg⁻¹. La reducción máxima de 49% en el comportamiento de lamido se obtuvo con el uso de BM-21 a 40 mg*kg⁻¹ (Figura 2).

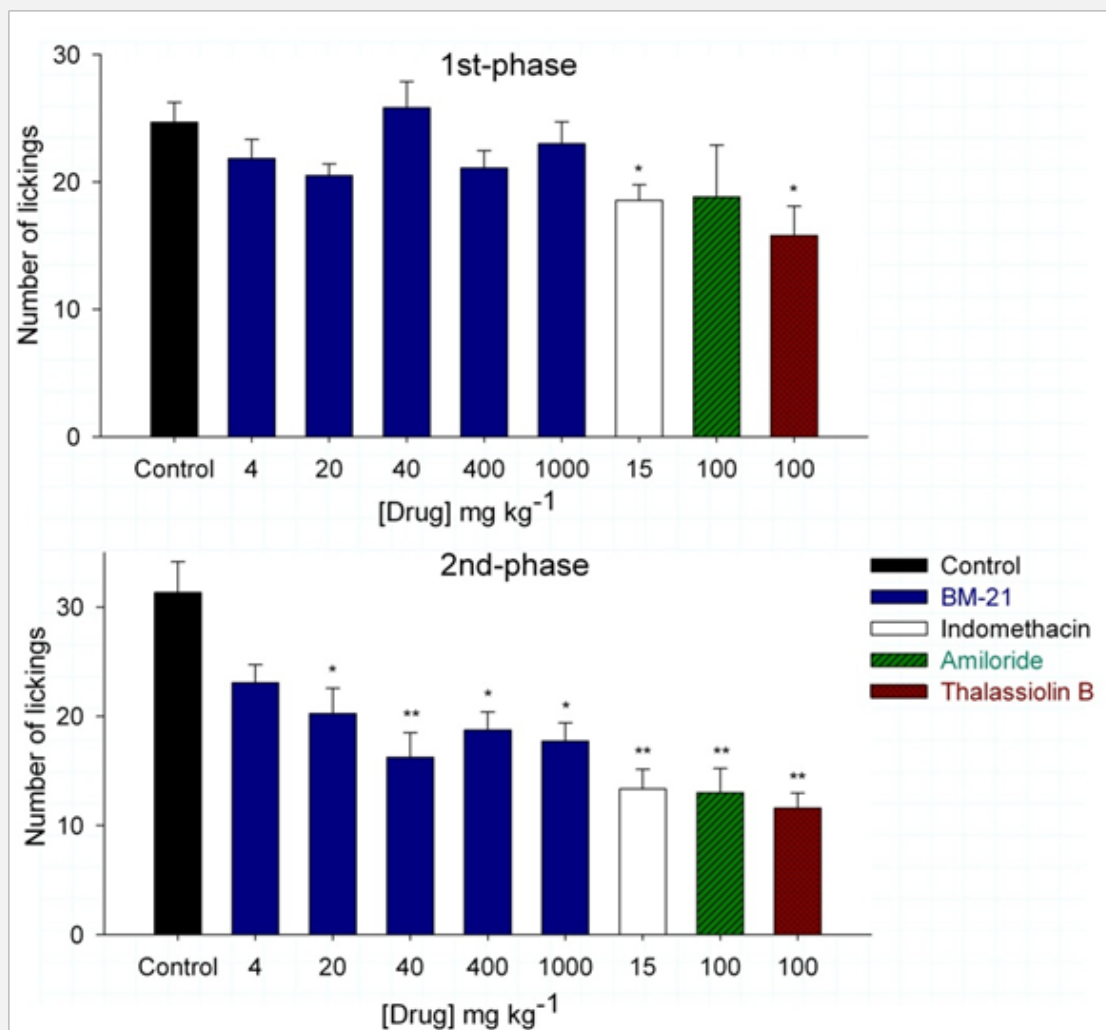


Figura 2. Efectos de BM-21 y thalassiolinaB sobre la nocicepción causada por formalina. *Indometacina y thalassiolina B produjeron una reducción significativa en el número de lamidos. Ningún efecto significativo de BM-21 o amilorida fue observado durante la primera fase de la nocicepción. En la segunda fase, a excepción de la dosis más baja de BM-21 (4 mg*kg⁻¹), todos los fármacos probados produjeron una reducción significativa en el número de lamidos. La magnitud de la acción de thalassiolin B fue similar a la de la amilorida.*

El uso de indometacina 15 mg*kg⁻¹ produjo una reducción significativa en ambas fases de la prueba de formalina (Figura 2). La conducta de lamido durante la primera fase no se vio afectada por amilorida 100 mmol*kg⁻¹ (n = 6), mientras que thalassiolina B 100 mmol*kg⁻¹mmol*kg⁻¹(n = 6) redujo 34% esta conducta. Ambos compuestos redujeron los lamidos durante la 2ª fase de manera similar (13 ± 2.2 para amilorida y 11.6 ± 1.4 para thalassiolina B).

Efectos de BM-21 y thalassiolina B sobre las corrientes ASIC

Para demostrar que las corrientes registradas fueron causadas por la activación de los ASIC, se realizó la caracterización farmacológica de las mismas. El uso de amilorida 10, 30, y 100 μM produjo inhibición de la corriente dependiente de la concentración de $39 \pm 3.8\%$ ($n = 3$), $67 \pm 4.5\%$ ($n = 7$), y $85 \pm 2.3\%$ ($n = 6$, Figura 3A, B y C), respectivamente. La aplicación de Gd^{3+} 100 μM ($n = 4$) inhibió significativamente la corriente en $90 \pm 1.3\%$ (Figura 3D). Empleando una solución extracelular libre de sodio ($n = 5$) la corriente entrante producida por un pulso ácido de pH 6.1 se redujo en 96 ± 1 (Figura 3D)

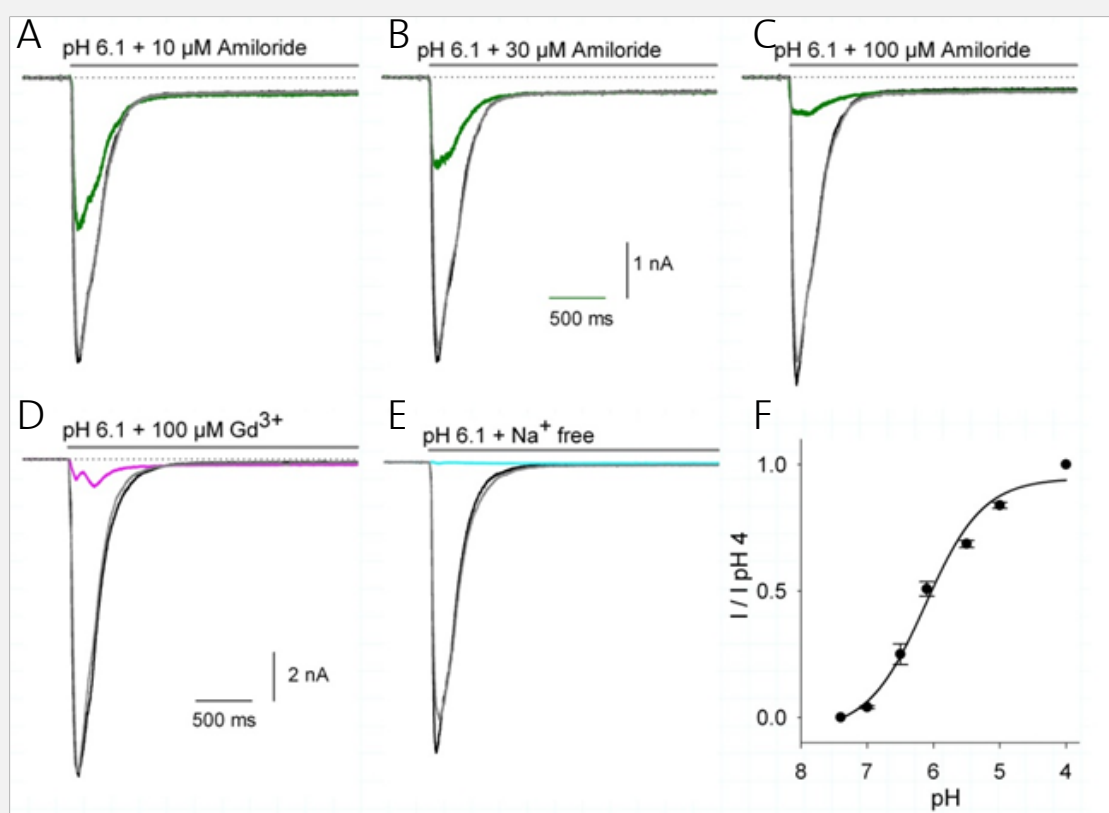


Figura 3. Efectos de amilorida, Gd^{3+} y solución extracelular libre de sodio sobre las corrientes ASIC. A-C) Amilorida produjo una inhibición de la corriente máxima, dependiente de la concentración y reversible, y no modificó significativamente la corriente de estado estacionario. En esta y las siguientes gráficas, los trazos en negro representan el control, en color se muestra el efecto de los fármacos y en gris el efecto del lavado. La línea punteada indica el cero de corriente, y la barra gris la aplicación de pH 6,1 + la aplicación de drogas. D) La aplicación de Gd^{3+} también produjo una inhibición reversible de la corriente. E) El uso de una solución extracelular libre de Na^+ disminuyó significativamente la corriente (a 4% de la corriente control), de manera reversible. F) La

relación corriente versus pHmostró una dependencia sigmoidal del pH con un pH_{50} de 6.12 ± 0.1 . Las corrientes fueron normalizadas con respecto de la corriente obtenida con pH 4

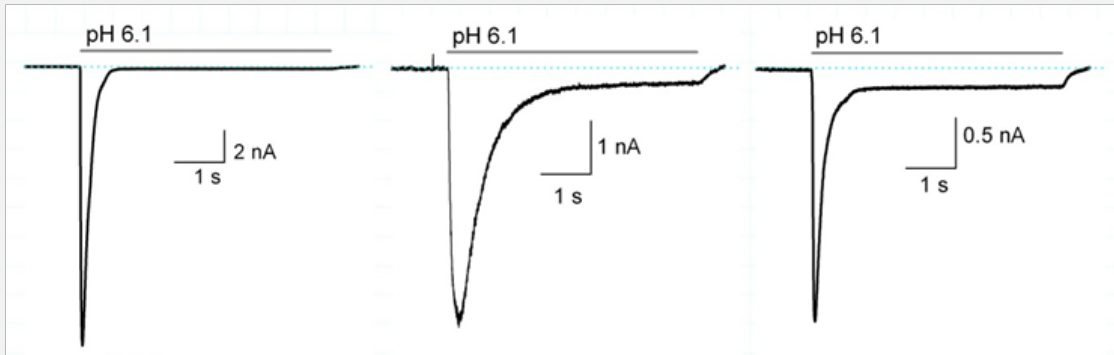


Figura 4. Corrientes ASIC típicas registradas en neuronas de DRG.

Las características de las corrientes ASIC registradas en las neuronas DRG variaron de una rápida corriente transitoria con poca corriente de estado estacionario, a una corriente lentamente desensibilizante ($\tau > 400 \text{ ms}$) con un gran componente de estado estacionario, y finalmente a una corriente con un claro estado estacionario.

Las corrientes ASIC registradas DRG mostraron características que indican la participación de diversas subunidades de ASIC en la corriente macroscópica (Figura 4)

La coaplicación de BM-21 con pH 6.1 redujo la amplitud del pico de las corrientes ASIC con desensibilización rápida de manera dependiente de la concentración (CI_{50} de $0.72 \pm 0.16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). BM-21 no tuvo ningún efecto significativo sobre las corrientes ASIC con desensibilización lenta ($\tau > 400 \text{ ms}$). El curso temporal de la desensibilización no se vio afectado significativamente al aplicar BM-21 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (control $\tau = 231.7 \pm 23.3 \text{ ms}$ contra $\tau = 319.6 \pm 56.6 \text{ ms}$, prueba t de Student $P > 0.05$) y su acción fue completamente reversible después de lavar la preparación (Figura 5).

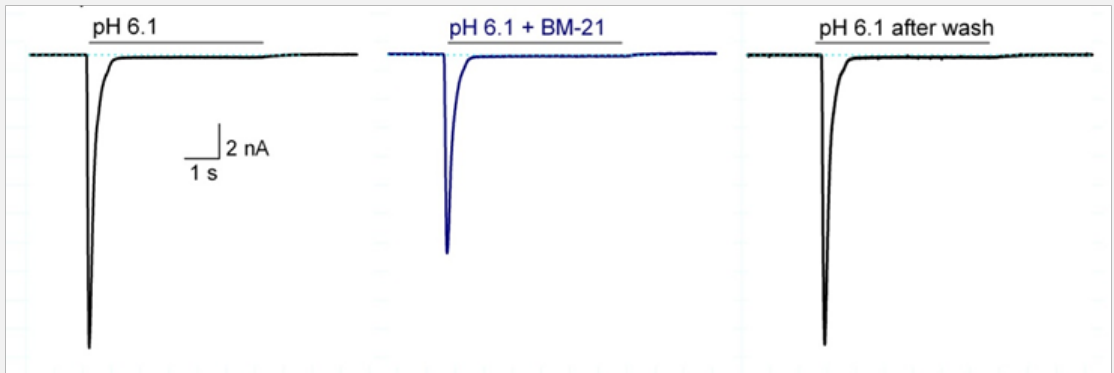


Figura 5. La aplicación de BM-21 redujo el pico de la corriente ASIC de manera reversible. Trazos representativos de un experimento que muestran el efecto de BM-21 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. A la izquierda, el registro control; al centro, la corriente ASIC en presencia de BM-21, y a la derecha luego del lavado de la preparación.

El uso de thalassiolina B produjo una reducción significativa de la amplitud del pico de corriente ASIC en células con desensibilización rápida ($\tau < 400 \text{ ms}$), sin ningún cambio significativo en la cinética de la corriente (Figura 6A). Ninguna acción fue ejercida por este compuesto en las corrientes ASIC con desensibilización lenta ($\tau > 400 \text{ ms}$) ($n = 8$; Figura 6B).

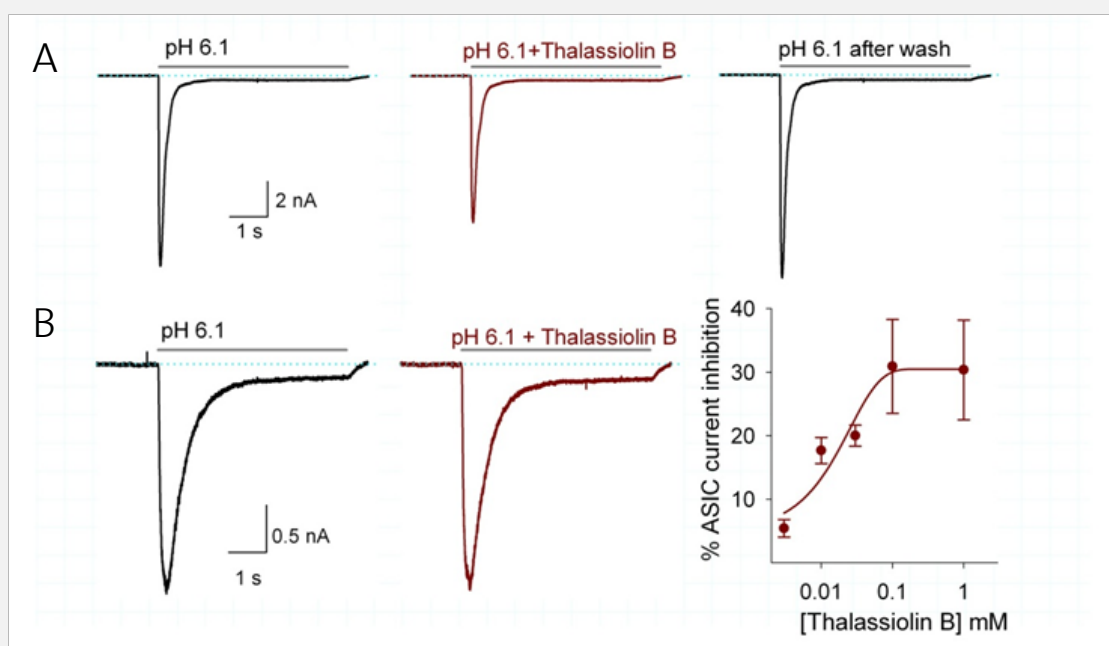


Figura 6. Efecto de thalassiolina B en las corrientes ASIC. A) Acción inhibitoria de thalassiolina B 0.03 mM sobre la corriente ASIC de una neurona con una $\tau = 283.3 \text{ ms}$; la inhibición fue del 23% con respecto al control y el efecto resultó totalmente reversible. B) No se observó ninguna acción significativa de thalassiolina B sobre corrientes ASIC con desensibilización lenta ($> 400 \text{ ms}$); el registro que se muestra tuvo una $\tau = 984 \text{ ms}$. C) Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de thalassiolina B sobre las corrientes ASIC con desensibilización $< 400 \text{ ms}$. La línea continua muestra el ajuste a empleando una ecuación de Hill; $IC_{50} = 27 \pm 2.6 \text{ } \mu\text{M}$.

Para estudiar la influencia de thalassiolina B en la activación (gating) de la corriente ASIC, se estudió la dependencia de la amplitud de la corriente con respecto al pH en condiciones control y en presencia de thalassiolina B 100 mM. El pH_{50} en el control fue de 6.12 ± 0.1 ($n = 7$) y con el uso de thalassiolina B fue 6.15 ± 0.1 ($n = 7$; $P \text{ ffl } 0,05$; Figura 7A). Para caracterizar la influencia potencial de la ocupación de sitios de unión a protones sobre las acciones de thalassiolina B, los efectos de la droga fueron estudiados mientras el pH de la solución del baño se varió entre 7.0 y 8.0 con incrementos de pH de 0.2 (curvade desensibilización de estado estacionario). El pH del baño precondicionante produjo un efecto significativo sobre la corriente producida por la perfusión a pH 6.1. Las relaciones pH precondicionante-efecto se construyeron en el control ($\text{pH}_{50} = 7.19 \pm 0.04$, $n = 5$) y en presencia de thalassiolina B 30 mM ($\text{pH}_{50} = 7.27 \pm 0.03$, $n = 7$; Figura 7B). Estos experimentos mostraron que la acción de thalassiolina B no depende del estado, cerrado o inactivado, de los canales ASIC. Otra serie experimental mostró que la amilorida ocluye el efecto de thalassiolina B (datos no mostrados).

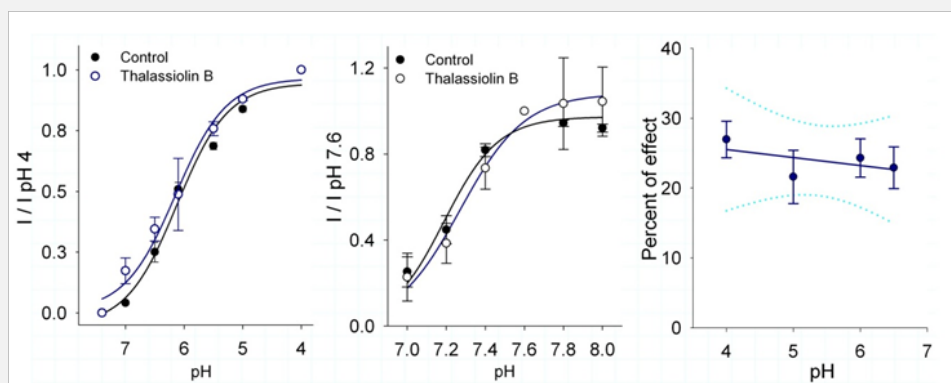


Figura 7. El efecto de thalassiolina B sobre las curvas de pH contra amplitud y de desensibilización de estado estacionario de la corriente ASIC. A) No se observó influencia significativa de thalassiolina B 100 mM sobre la dependencia de pH de la amplitud de la corriente ASIC. **B)** La aplicación de thalassiolina B no modifica significativamente la desensibilización de estado estacionario de las corrientes ASIC. **C)** Análisis de los efectos de thalassiolin B en función del pH utilizado para activar la corriente; no existe una correlación significativa ($P > 0.05$). La línea continua muestra la regresión lineal (pendiente = 0.27); las líneas punteadas muestran los intervalos de confianza ($P \text{ ffl } 0.05$).

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la acción antinociceptiva de BM-21 en los modelos farmacológicos clásicos de dolor producido por estimulación térmica (placa caliente) y química (inyección de ácido acético y formalina), y de thalassiolina B en la prueba de la formalina en ratones. También demuestra que al menos una parte de esa acción puede deberse al efecto de ambos compuestos sobre canales ASIC. Regalado y colaboradores (2009) determinaron que el contenido fenólico del extracto BM-21 es de $18 \pm 1.5\%$. Consistente con esto, el procedimiento de separación del extracto dio como resultado el aislamiento de thalassiolina B, que resultó ser el constituyente fenólico más importante de BM-21. Nuestros datos indican que los compuestos fenólicos, y en particular thalassiolina B, pueden contribuir en un grado significativo a la acción biológica de BM-21. De hecho, los estudios in vivo utilizando el ensayo de formalina en ratones apoyan la idea de que thalassiolina B tiene una acción antinociceptiva per se.

Se sabe que algunos mecanismos de nocicepción involucran a los canales ASIC (Lingueglia, 2007). Estudios previos han documentado que estos canales son sensibles a las acidificaciones extracelulares que se producen durante la inflamación, y que su expresión (especialmente de ASIC3) se incrementa en las neuronas sensoriales de ratas en esta condición patológica (Devalet al., 2008). Así, en un intento de caracterizar el mecanismo por el que BM-21 ejerce su acción antinociceptiva se evaluaron los efectos de BM-21 y thalassiolina B sobre corrientes ASIC. Se encontró que tanto BM-21 como thalassiolina B fueron capaces de disminuir la amplitud máxima de las corrientes ASIC, lo que indica que, muy probablemente, el efecto de BM-21 puede ser debido a la presencia de thalassiolina B.

La acción inhibidora de thalassiolina B sobre corrientes ASIC fue selectiva, actuando sólo en neuronas que presentaron una corriente con desensibilización rápida, no ejerciendo efecto significativo sobre las corrientes con desensibilización lenta (las llamadas corrientes ASIC2-like (Dubé et al., 2005), lo que indica que su efecto puede ser específico.

Sin embargo, debido a que las corrientes ASIC en las neuronas de DRG son probablemente causadas por la combinación de dos o más subunidades de ASIC coensambladas como heteromultímeros, y que en una misma célula coexisten múltiples poblaciones de canales ASIC (Benson et al., 2002; Hesselager et al., 2004) no fue posible determinar su selectividad. El efecto de thalassiolina B no muestra dependencia del pH utilizado para activar la corriente ASIC, lo que indica que no ocurren cambios conformacionales de la molécula en función del pH. La coaplicación de amilorida ocluye el efecto de thalassiolina B, lo que sugiere que actúan por medio de un mecanismo similar. El efecto de thalassiolina B no es dependiente del voltaje, lo cual indica que, probablemente, no está entrando en el potencial de campo de la membrana. La thalassiolina B requiere ser preaplicada para ejercer un efecto inhibitorio consistente; además, sólo es capaz de bloquear parcialmente la corriente ASIC (alrededor de 30% en las concentraciones más altas), lo que sugiere que no es un bloqueador del poro. Estudios futuros utilizando la expresión heteróloga de subunidades de ASIC podrían contribuir a definir la selectividad y el mecanismo de acción de thalassiolina B sobre estos canales.

CONCLUSIONES

Hasta donde sabemos, este es el primer informe de la presencia de un inhibidor de canales ASIC extraído de una planta marina asociado a un compuesto fenólico identificado. En comparación con otras sustancias naturales de naturaleza peptídica con acción antinociceptiva, como PcTx1 y APETx2, la naturaleza no peptídica de thalassiolina B puede ofrecer una ventaja para futuras aplicaciones terapéuticas relacionadas con el control del dolor. Sin embargo, estudios adicionales son todavía necesarios para determinar su selectividad para subunidades ASIC específicas, y para determinar su potencia, el tiempo requerido para alcanzar niveles terapéuticos in vivo y su mecanismo de acción.

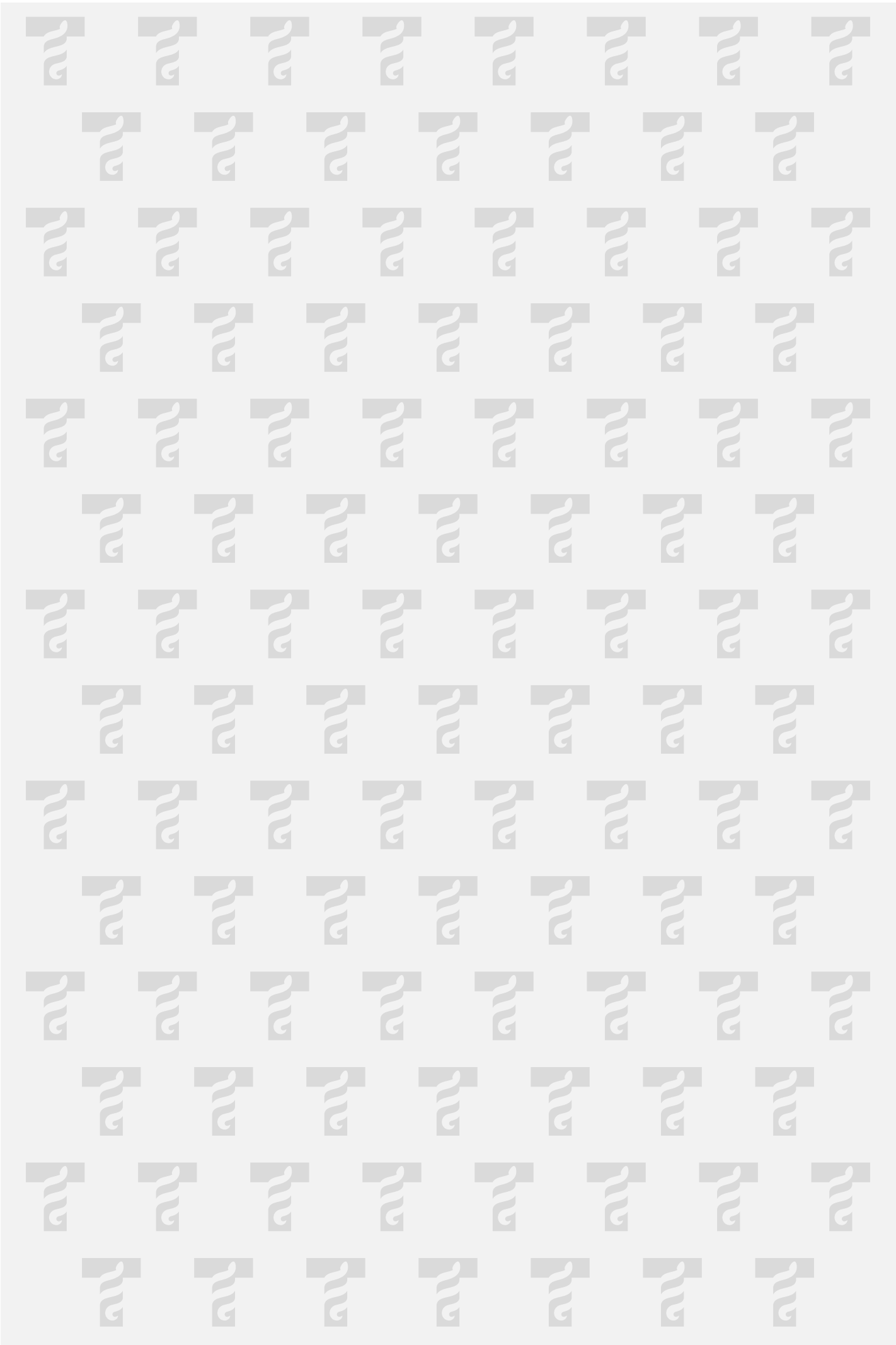
AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado parcialmente por VIEP-BUAP (ref. 169835).

REFERENCIAS

- Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., Snyder, P.M., 2002. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci* 99, 2338-2343.
- Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., Lingueglia, E., 2008. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27,3047-3055.
- Dubé, G.R., Lehto, S.G., Breese, N.M., Baker, S.J., Wang, X., Matulenko, M.A., Honoré, P., Stewart, A.O., Moreland, R.B., Brioni, J.D., 2005. Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567 a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain* 117,88-96.
- Garateix, A., Salceda, E., Menéndez, R., Regalado, E.L., López, O., García, T., Morales, R.A., Laguna, A., Thomas, O.P., Soto, E., 2011. Antinociception produced by Thalassiatestudinum extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. *Molecular Pain* 7:10.
- Hesselager, M., Timmermann, D.H., Ahring, P.K., 2004. pH dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channels subunits. *J Biol Chem*, 279, 11006-11015.
- Jones, N.G., Slater, R., Cadiou, H., McNaughton, P., McMahon, S.B., 2004. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci*, 24,10974-10979.
- Krishtal, O., 2003. The ASICs: Signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 26, 477-483.
- Lingueglia E., 2007. Acid sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 282, 17325-17329.

- Mercado, F., Vega, R., Soto, E., 2005. Canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones: estructura, función, farmacología y fisiopatología. *Rev Neurol* 41, 667-675.
- Nuñez, R., Garateix, A., Laguna, A., Fernández, M.D., Ortiz, E., Llanio, M., Valdés, O., Rodríguez, A., Menéndez, R., 2006. Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical and others industrial applications. *Pharmacologyonline* 3, 111-119.
- Regalado, E.L., Rodríguez, M., Menéndez, R., Concepción, A.A., Nogueiras, C., Laguna, A., Rodríguez, A.A., Williams, D.E., Lorenzo-Luaces, P., Valdés, O., Hernández, Y., 2009. Repair of UVB-damaged skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside thalassiolin B isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Mar Biotechnol* 11, 74-80.
- Salceda, E., Garateix, A., Soto, E. 2002. The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1067-1074.
- Vega, R., Rodríguez, U., Soto, E., 2009. Acid-sensing ionic channel functional expression in the vestibular endorgans. *Neurosci Lett* 463, 199-202.
- Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H, Jr., Welsh, M.J., 2002 The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 34, 463-477.
- Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., 2006. Acid-sensing ion channels: advances, questions, and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 29, 578-586.
- Yagi, J., Wenk, H.N., Naves, L.A., McCleskey, E.W., 2006. Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ Res* 99, 501-509.



Laboratorio de Venómica y Proteómica Estructural

Juan J. Calvete

Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, c/Jaime Roig 11, 46010
Valencia (España)

jcalvete@ibv.csic.es

El Laboratorio de Venómica y Proteómica Estructural desarrolla protocolos proteómicos para caracterizar en detalle la composición de los venenos de serpientes ("venómica") [1] y estudiar la eficacia, especificidad y paraespecificidad de antivenenos ("antivenómica") [2]. Estas investigaciones se enmarcan en los objetivos de la Global Snakebite Initiative ([Global Snakebite Initiative](#)), cuyo principal objetivo es movilizar e integrar los recursos, la capacidad, la experiencia y las sinergias de científicos básicos, clínicos y de desarrollo tecnológico de los campos de la venómica y la toxinología en la búsqueda, desde el mundo académico, de soluciones al envenenamiento ofídico: *"The Global Snakebite Initiative is an internationally-active non-profit organisation, registered in Australia, and led by snakebite experts who are dedicated to improving access to good quality, robustly tested, safe, effective antivenoms in the world's poorest communities. We hope you will join us in trying to improve the prevention, first aid and treatment of snakebites, and in bringing recognition to the rehabilitation needs of snakebite victims around the world."* [3].

La consecución de esta iniciativa requiere la estrecha colaboración entre instituciones de países afectados por la patología y de las naciones industrializadas. El éxito de la GSI está vinculado al desarrollo de la complementariedad entre aquellos que poseen la experiencia, y la visión de las limitaciones locales, en el tratamiento de la enfermedad y de quienes tienen

acceso a las tecnologías “ómicas” necesarias para estudiar las bases moleculares de la patología e identificar dianas de intervención terapéutica [3]. Nuestro laboratorio trabaja en estrecha colaboración con otros laboratorios participantes en la GSI, el Instituto Clodomiro Picado (San José, CR), la Alistair Reid Venom Research Unit (Liverpool School of Tropical Medicine, UK), la Australian Venom Research Unit (University of Melbourne, Australia) [3].

En el Laboratorio de Venómica y Proteinómica Estructural partimos de la premisa de que el conocimiento detallado del proteoma de los venenos y sus efectos patológicos son requisitos esenciales para identificar las toxinas responsables del cuadro fisiopatológico del envenenamiento. La aplicación de la venómica y antivenómica al estudio de la composición y entendimiento de las tendencias evolutivas de los venenos, la identificación de características convergentes y divergentes entre los diferentes clados del árbol filogenético de los ofidios, y el perfil inmunológico de los venenos de serpientes, proporcionan las claves para la elaboración de antídotos poliespecíficos [4]. Así, los estudios proteómicos han evidenciado que los venenos de serpientes de los géneros *Viperinae* (ej. víboras europeas, africanas y asiáticas) y *Crotalinae* (ej. crótalos asiáticos y serpientes de cascabel americanas) están compuestos por diversas combinaciones de toxinas pertenecientes a solo un puñado de familias proteicas. La complejidad específica de cada veneno radica en el tipo y abundancia relativa de las toxinas que expresa. Asimismo, las investigaciones venómicas han puesto en evidencia la existencia de variabilidad fenotípica (geográfica y ontogenética) intra- e interespecífica en la composición de los venenos. La identificación de variaciones intraespecíficas en los venenos de especies de relevancia médica es muy importante para el reconocimiento de cuadros clínicos divergentes, así como para la selección de las mezclas de venenos más adecuadas para la generación de los correspondientes

antídotos. Por otra parte, la identificación de patrones venómicos convergentes entre especies divergentes y el estudio de su grado de inmunogenicidad cruzada pueden ampliar el rango de aplicación terapéutica de antivenenos existentes.

Se atribuye al físico Freeman Dyson la afirmación de que las revoluciones científicas están más a menudo sustentadas por avances tecnológicos que por nuevos conceptos. Las tecnologías “ómicas” de alto rendimiento han revolucionado el panorama de la investigación biológica, y muchos laboratorios dotados de estas tecnologías han cambiado el paradigma clásico de hacer investigación basada en una hipótesis a priori a una aproximación libre de hipótesis y basada en la interpretación a posteriori del conjunto de datos generado de forma masiva. Sydney Brenner denominaba “cazadores” a los primeros, “recolectores” a los segundos [5]. Los más de 2.5 millones de seres humanos afectados por las consecuencias del ofidismo merecen más atención de la comunidad científica. Sin embargo, ninguna de las aproximaciones “ómicas” aisladamente es apropiada en la búsqueda de soluciones para esta patología desatendida. Un nuevo paradigma debe adoptarse. El nuevo paradigma debe estar basado en un profundo conocimiento del sistema biológico, cómo solo los cazadores pueden lograr, pero haciendo uso de las herramientas de los recolectores.

El desarrollo a finales de la década de 1980 de métodos de ionización para moléculas termolábiles y su análisis mediante espectrometría de masas ha revolucionado la investigación de los sistemas biológicos. En particular, la fragmentación de iones peptídicos, generados por proteólisis (utilizando generalmente tripsina) de las proteínas de interés, permite su secuenciación y, por tanto, la identificación de la proteína original. El PDF adjunto analiza las reglas básicas de la interpretación de espectros de masas [6]. El *Tutorial* de John Cottrell

es de lectura recomendada para iniciarse en la comprensión de las reglas de fragmentación de iones peptídicos y la interpretación de los correspondientes espectros MS/MS [7]. Tanto el PDF de este artículo como material suplementario en PowerPoint están libremente accesibles en: <http://www.journals.elsevier.com/journal-of-proteomics/tutorials/international-proteomics-tutorial-programme/>. El portal de Ion Source (<http://www.ionsource.com/>) también contiene guías prácticas y recursos didácticos sobre principios e interpretación de espectros de masas.

Bibliografía

- [1] Calvete JJ . **Proteomic tools against the neglected pathology of snakebite envenoming**. Exp. Rev. Proteomics **8** (2011) 739-758
- [2] Pla, D., Gutiérrez, J.M. & Calvete, J.J. **Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols**. Toxicon **60** (2012) 688-699
- [3] Williams, D.J., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., Brown, N.I., Casewell, N.R., Harrison, R.A., Rowley, P.D., O'Shea, M., Jensen, S.D., Winkel, K.D. & Warrell, D.A. **Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa**. J. Proteomics **74** (2011) 1735-1767
- [4] Calvete JJ. **Envenenamiento por mordedura de serpiente. La proteómica facilita el desarrollo de tratamientos para el ofidismo, una patología desatendida**. Investigación y Ciencia **Junio** (2010) 9-11.
- [5] Brenner S. **Hunters and gatherers**. The Scientist **16** (2002) 14.
- [6] Calvete JJ. **Consideraciones sobre la interpretación de espectros de masas: sólo es cuestión de aplicar un par de reglas generales y matemáticas elementales**. Proteómica **4** (2009) 16-28.
- [7] Cottrell JS.. **Protein identification using MS/MS data**. J. Proteomics **75** (2011) 1842-1851

Información complementaria:

http://www.instituto-roche.es/Biotecnologia_nuevas_vias_hacia_la_medicina_personalizada/V66.html

http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/estrategias-proteomicas-para-hacer-frente-a-la-mordedura-de-serpiente_369

Crisol

Suplemento de Ciencia y Tecnología N°218 Octubre 2008

Gracias a la tecnología de punta y al conocimiento científico de la proteómica, en una primera fase de estudio especialistas costarricenses y españoles caracterizaron la composición de los venenos de las principales serpientes del país y comprobaron la calidad y eficacia del suero antiofídico polivalente como neutralizador de los venenos de serpientes en la región.

El antiveneno lo produce y distribuye el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica (UCR) hacia toda Centroamérica y la parte norte de Suramérica: Colombia, Venezuela y Perú.

Este es uno de los resultados de la valiosa alianza que mantiene este instituto, con el Laboratorio de Proteómica Estructural del Instituto de Biomedicina de Valencia, España.

Según explicó el Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez, subdirector del ICP, la proteómica es un nuevo campo de trabajo, que emplea técnicas moleculares de punta, solo que dirigidas específicamente hacia las proteínas que conforman cualquier sustancia biológica, fluido, secreción, sangre, venenos, etc.



El Dr. Julián Fernández, joven investigador del Instituto Clodomiro Picado, realiza estudios de la proteómica de los venenos de serpientes (foto Omar Mena).

Venenos y antivenenos de serpientes

Profundizan conocimientos con nuevas tecnologías

Lidiette Guerrero Portilla <lidiette.guerrero@ucr.ac.cr>

(Foto Dennis Castro Inera)

El equipo profesional que lidera el Dr. Juan José Calvete, en España, realiza investigaciones de muy alto nivel en este campo, pero no había incursionado en los venenos de serpientes de América Latina, especialidad de quienes laboran en el Instituto Clodomiro Picado de la UCR.

La relación se inició como una opción de intercambio académico en el 2007, por medio de la cual especialistas nacionales y españoles realizan visitas e intercambian conocimientos teórico-prácticos, efectúan investigaciones conjuntas y han logrado tanto éxito que emprenderán nuevas iniciativas por dos años más.

“En el Instituto desde hace muchos años venimos trabajando para conocer la composición de los venenos, con la idea de purificar toxinas para comprender su estructura química y mejorar los antivenenos que se producen. Por ejemplo, se purificaron miotoxinas que producen necrosis o muerte muscular, toxinas hemorrágicas que ocasionan sangrado, otras que afectan la coagulación, pero nunca habíamos tenido la oportunidad de hacer un análisis global de los venenos en todos sus componentes, que es lo que permite la proteómica”, afirmó el Dr. Gutiérrez.

Según indicó, los venenos son fluidos muy complejos, compuestos de cientos de proteínas diferentes, las cuales con esas nuevas técnicas fueron identificadas en la proporción exacta en que se encuentran en cada uno de los venenos estudiados; y luego ampliaron el análisis hacia los antivenenos, con la idea de conocer la neutralización que producen.

Los resultados son tan positivos que incluso los llevó a acuñar dos nuevos conceptos científicos, como son el de la venómica, para el estudio de los venenos empleando la proteómica, y el de antivenómica, para el estudio de la reactividad o neutralización de los antivenenos hacia los venenos, empleando la proteómica.

La información que ofrecen los estudios de antivenómica es fundamental para Gutiérrez, “porque somos productores y desarrolladores de antivenenos o sueros antiofídicos, y esto nos permite saber con un detalle muy fino contra cuáles de los componentes de los venenos están reaccionando los antivenenos”.

Valiosos resultados

La experiencia de intercambio se inició con la visita de la Dra. Yamileth Angulo, directora del ICP, al Instituto de Biomedicina de Valencia, donde investigó los venenos de las

serpientes comúnmente llamadas mano de piedra. Luego la siguió el Dr. Bruno Lomonte, quien se dedicó a estudiar dos serpientes arborícolas, como son la lora y la bocaracá.

Asimismo, los doctores Alberto Alape, Marieta Flores-Díaz y Mahmood Sasa se dedicaron a realizar el análisis de la proteómica de la serpiente terciopelo, una de las que causa más accidentes ofídicos en Costa Rica.

Por su parte, las doctoras Alexandra Rucavado y Teresa Escalante, junto con el Dr. Julián Fernández, trabajan en el análisis del veneno de dos serpientes importantes de las islas caribeñas Martinica y Santa Lucía, que llaman la atención porque en el resto del Caribe no hay serpientes venenosas.

Gutiérrez y Calvete también llevan a cabo un estudio sobre los venenos de las especies de cascabel de Centroamérica y Suramérica.

Esa labor científica además se ha nutrido con las visitas al Instituto Clodomiro Picado del Dr. Calvete y de las doctoras Libia Sanz y Paula Juárez, para conocer de cerca el trabajo científico y de producción de sueros que se realiza en Costa Rica.

Gutiérrez considera que la alianza solo ganancias ha producido para ambas partes, pues se potenciaron los conocimientos y las experiencias. Gracias a este vínculo se han publicado cinco artículos científicos en el *Journal of Proteome Research*, una de las más prestigiosas revistas científicas internacionales en el tema de la proteómica, y esperan publicar otros estudios.

Además, con el conocimiento acumulado y el equipo disponible, en el Instituto Clodomiro Picado están desarrollando pruebas de antivenómica con la plataforma metodológica que aprendieron en España y con los métodos adaptados en Costa Rica.

Las pruebas de venómica solo se pueden realizar parcialmente en el país, debido a que faltan equipos que por su alto costo no ha podido adquirir la UCR, aunque se tiene programado hacerlo a corto plazo.

La idea es instalar un laboratorio propio de proteómica en ese Instituto, que le permita seguir profundizando en este campo y ofrecer servicios a otros científicos costarricenses que lo necesiten.

El trabajo de colaboración continuará, pues el objetivo de la nueva etapa es completar el estudio de los venenos de serpientes del país y hacer los estudios de la antivenómica correspondientes, con el financiamiento otorgado por la Vicerrectoría de Investigación de la UCR, la Fundación CRUSA y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España (CSIC).

Envenenamiento por mordedura de serpiente

La proteómica facilita el desarrollo de tratamientos para el ofidismo, una patología desatendida

Las primeras serpientes ya campaban a sus anchas por nuestro planeta cuando los mamíferos apenas empezaban a esbozarse. Las serpientes evolucionaron a partir de un ancestro común a los lagartos durante el tiempo de los grandes dinosaurios, en el período Cretácico (hace unos 130 millones de años); sin embargo, hasta hace unos 36 millones de años no aparecieron los primeros colúbridos. La radiación de los colúbridos coincide con el advenimiento y diversificación de los roedores, mamíferos esenciales en la dieta de estos reptiles.

En la actualidad, el suborden *Serpentes* de los reptiles escamosos (*Squamata*) agrupa a unas 3000 especies en unos 400 géneros y 18 familias, presentes en hábitats terrestres y acuáticos, desde el mar hasta los desiertos, en todos los continentes, a excepción de la Antártida.

Las serpientes de mayor tamaño y fuerza (pitones, boas y anacondas) utilizan para alimentarse una estrategia mecánica: atrapan a la presa entre sus anillos constrictores impidiéndole la respiración hasta que muere por asfixia. Las serpientes más pequeñas (víboras, serpientes de cascabel, cobras), en cambio, han desarrollado otra arma evolutiva más

refinada: el veneno. El veneno de las especies actuales de serpientes ponzoñosas se originó en etapas tempranas de la historia evolutiva de lagartos y serpientes por reclutamiento y transformación, mediante evolución acelerada, de proteínas comunes.

Ofidismo

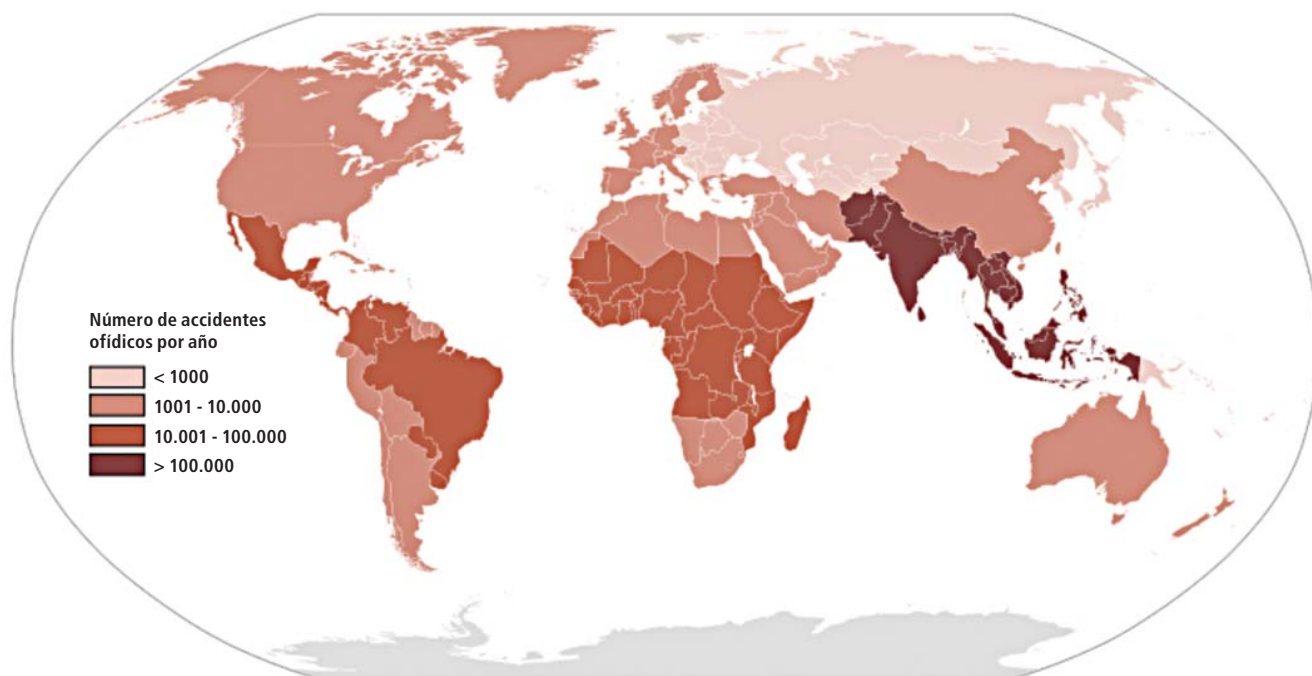
Los venenos de los vipéridos (subfamilias Viperinae y Crotalinae) poseen un arsenal de proteínas con capacidad de degradar la matriz extracelular y obstruir la cascada de coagulación, el sistema hemostático y la reparación tisular. Las manifestaciones clínicas del envenenamiento por vipéridos y crotálicos pueden ser locales o sistémicas. Los efectos locales se presentan minutos después de la inyección del veneno: incluyen dolor, edema, equimosis y hemorragia local; en numerosos casos cursan con necrosis del área que rodea la mordedura. Entre los efectos sistémicos se observan alteraciones en la coagulación sanguínea y episodios hemorrágicos alejados del sitio de inyección del veneno, miotoxicidad, fallo renal agudo e insuficiencia cardíaca, entre otras.

Unas 640 especies de ofidios son venenosas; de éstas, sólo una fracción re-

ducida representa un peligro serio para nuestra especie. La mayoría de los accidentes por mordedura de serpiente ocurren en regiones pobres de países tropicales de Centroamérica y Sudamérica, África subsahariana y Asia; afectan sobre todo a trabajadores y niños de zonas rurales. Según la OMS ocurren anualmente 5,4 millones de accidentes ofídicos. De éstos, 2,7 millones producen envenenamiento y dan lugar a más de 125.000 muertes al año y a un número mayor de personas con lesiones permanentes. Estas cifras hospitalarias podrían estar subestimando la realidad, puesto que numerosas víctimas acuden a curanderos locales o fallecen en su casa sin haber pasado por un centro de salud.

Tratamientos: de la inmunología a la proteómica

La única terapia eficaz contra un envenenamiento por mordedura de serpiente es la administración parenteral de un antiveneno. Los sueros antiofídicos se obtienen mediante la inmunización de équidos y camélidos con dosis subletales de veneno completo. La fracción de inmunoglobulinas purificadas constituye el correspondiente antiveneno. La administración de proteínas extrañas puede



1. Incidencia del envenenamiento por mordedura de serpiente.



producir en el organismo reacciones adversas, incluida la muerte por shock anafiláctico. Por otra parte, la producción de antivenenos tradicionales o de corte biotecnológico resulta cara para los sistemas sanitarios de numerosos países donde el ofidismo constituye un grave problema de salud pública. Al no ser un negocio rentable, algunas empresas farmacéuticas multinacionales han dejado de fabricar antivenenos.

Para tratar de paliar el ofidismo, en nuestro laboratorio de proteínica estructural hemos desarrollado protocolos basados en técnicas proteómicas que nos permiten determinar la composición proteínica (proteoma) y la abundancia relativa de las familias de toxinas en un veneno (“venómica”). Este conocimiento resulta esencial a la hora de escoger la mezcla idónea de venenos para lograr un antiveneno polivalente del más amplio espectro posible.

La evolución juega a nuestro favor. Nuestros estudios venómicos muestran que, a pesar de la aparente complejidad

2. Serpientes de interés médico en Norteamérica (*Crotalus atrox*), Centroamérica (*Bothrops asper*) y Sudamérica (*Bothrops atrox* y *Crotalus durissus terrificus*).

de los venenos, éstos constan de un número restringido de familias proteicas cuya distribución y abundancia relativa varían ampliamente entre géneros, especies y subespecies.

Los estudios sobre inmunorreactividad cruzada de antivenenos existentes y venenos de serpientes no incluidas en el cóctel de inmunización (“antivenómica”) demuestran una gran conservación de determinantes antigénicos (epítomos) intraespecíficos e interespecíficos en todas las familias de toxinas. Ello permite reducir el problema de la generación de un antiveneno de amplio espectro a la formulación de una mezcla de venenos que incluya el complemento de epítomos necesarios para generar anticuerpos que bloqueen la acción tóxica de todas las familias proteicas presentes en el veneno diana.

El veneno constituye una innovación adaptativa. Su composición está modulada por las condiciones ecológicas a tra-

vés de la selección natural. La adaptación al medio conlleva divergencias (especies taxonómicamente cercanas desarrollan formulaciones venómicas distintas) y convergencias (especies lejanas producen venenos de acción tóxica similar) en la composición del armamento químico de los animales venenosos.

Dado que la filogenia no refleja el grado de similitud composicional de los venenos, la taxonomía no constituye una herramienta fiable para establecer una clasificación molecular o funcional. El fenotipado por combinación de técnicas cromatográficas y espectrométricas está resultando una estrategia adecuada para la identificación y cuantificación de las toxinas mayoritarias en los venenos. Venómica, antivenómica y fenotipado venómico constituyen las herramientas que aporta la proteómica para hacer frente al envenenamiento por mordedura de serpiente, una patología desatendida.

3. Mediante electroforesis, espectrometría de masas y otras técnicas, se ha obtenido la composición del veneno de la serpiente de cascabel diamantada del oeste (*Crotalus atrox*). La mayor parte corresponde a metaloproteasas (SVMP, de "snake venom metalloprotease") y serinoproteasas. Se han hallado también disintegrinas (inhiben la agregación plaquetaria), fosfolipasas A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidasa (LAO), C-lectinas, péptidos vasoactivos y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP). Este cóctel de toxinas explica los efectos citotóxicos, miotóxicos, hemotóxicos y hemorrágicos que suele causar el envenenamiento por *Crotalus atrox*.

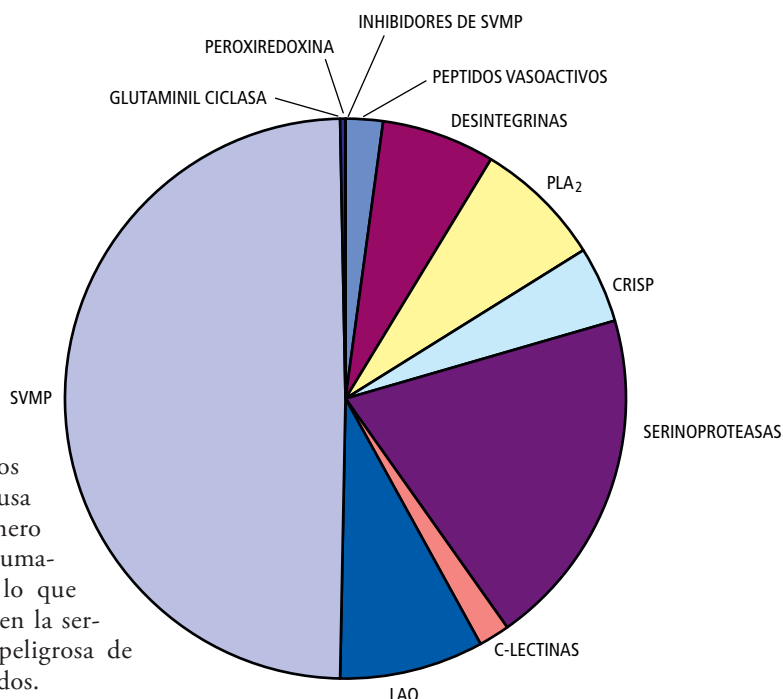
El veneno de *Crotalus atrox*

Las serpientes de cascabel poseen en la punta de la cola unos característicos anillos óseos sonoros, de ahí su otro nombre, crótalos. Pertenecen al género *Crotalus*. Este clado se originó durante el Mioceno, hace unos 20 millones de años, en la Sierra Madre Occidental de la meseta mexicana; su dispersión hacia el norte y el sur ha originado las 34 especies de crótalos que medran en América, desde el sudeste de Canadá al norte de Argentina (el lector hallará un inventario actualizado de serpientes en <http://www.reptile-database.org>). Sus mordeduras son tremendamente dolorosas; pueden resultar letales para un humano si no se le administra el antídoto adecuado.

La serpiente *Crotalus atrox*, cascabel diamantada del oeste, habita en grandes extensiones de terreno árido, desde Arkansas a California y norte de México. Los animales adultos sobrepasan los 120 centímetros de longitud y los 6,7 kilogramos de peso. *Crotalus atrox* posee un potente veneno: la dosis letal media intramuscular para ratones es de

20 miligramos por kilo. Causa un gran número de muertes humanas al año, lo que la convierte en la serpiente más peligrosa de Estados Unidos.

Mediante técnicas proteómicas, química combinatoria y otros métodos, hemos determinado las toxinas que componen el veneno de *Crotalus atrox*. Los resultados, publicados en 2009 en el *Journal of Proteome Research*, muestran que el arsenal de toxinas de esta especie se reduce a un par de docenas de proteínas: el 70 por ciento corresponde a metaloproteasas dependientes del catión zinc (Zn²⁺) y endoproteasas del grupo de las serinoproteasas. Estas toxinas degradan la matriz extracelular y afectan al sistema hemostático. Encontramos también inhibidores de la agregación plaquetaria (disintegrinas), miotoxinas (fosfolipasas A₂), L-aminoácido oxidasa, C-lectinas y péptidos vasoactivos. Ello explica en gran medida los efectos citotóxicos, miotóxicos, hemotóxicos y hemorrá-



cos típicos del envenenamiento por *Crotalus atrox*.

Esta investigación se enmarca en un proyecto más amplio que se propone desentrañar las bases moleculares de la evolución de los venenos del género *Crotalus*. La elucidación de la composición y mecanismos de diversificación adaptativa de estos venenos facilitará la obtención de un suero anticrotálico panamericano que neutralice todos los venenos del género. La producción de antiveneños de amplio espectro ofrece además una estrategia para abaratar costes y optimizar los recursos terapéuticos.

Juan J. Calvete

Laboratorio de Proteínica Estructural
Instituto de Biomedicina de Valencia

Calidad del aire urbano

No contaminan sólo los motores. También las obras y el desgaste de frenos, neumáticos y firme de rodadura

La Comisión Europea publicó en 2008 la Directiva de Calidad del Aire y Aire Limpio para Europa (2008/50/CE), donde se fijan valores límite (VL) de exposición de la población —predominante en zonas urbanas— para contaminantes atmosféricos. Entre éstos destacan por su dificultad de cumplimiento los VL de dióxido de nitrógeno (NO₂) y de partí-

culas respirables PM₁₀ y PM_{2,5} (que indica la masa de material particulado, PM, de diámetro inferior al número, en micrometros, indicado en el subíndice). Sin olvidarse del ozono (O₃) troposférico, con grandes zonas de incumplimiento normativo fuera de las ciudades. La directiva supone un reto político, ambiental, técnico e incluso científico.

Un parque móvil creciente

En la mayoría de los casos, la superación de los valores límite de NO₂ y PM₁₀ o PM_{2,5} se producen en áreas próximas al tráfico rodado. El parque automovilístico ha crecido de forma notable en los últimos decenios, sin limitaciones de acceso a las zonas urbanas. "Hay que acondicionar la ciudad para el automóvil",

Consideraciones sobre la interpretación de espectros de masas: sólo es cuestión de aplicar un par de reglas generales y matemáticas elementales

Juan J. Calvete

Laboratorio de Proteínómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia. Email: jcalvete@ibv.csic.es

Resumen

La identidad de todo compuesto está definida en su estructura química. La espectrometría de masas es una potente herramienta para investigar la estructura de los compuestos químicos, incluidas la masa y la ordenación secuencial de sus elementos constituyentes. Sin embargo, los analizadores de masas solo pueden detectar iones. Las partículas neutras, sean moléculas o radicales, representan *materia oscura* para el analizador de masas y son eliminadas por el sistema de vacío del espectrómetro de masas. Los iones son partículas cargadas y, por tanto, su posición en el espacio puede ser manipulada mediante campos eléctricos y magnéticos. Conceptualmente, pues, un espectrómetro de masas puede considerarse un manipulador de iones. La interpretación del espectro de masas es la clave para la asignación estructural del correspondiente ión. Y, por complicado que pudiera parecer, interpretar espectros de masas es una cuestión sencilla: sólo se requiere aplicar rigurosamente unas pocas reglas generales derivadas de los procesos de ionización y fragmentación de los analitos y un nivel de cálculo de matemáticas elementales. De eso trata esta revisión.

1. Brevísima historia del nacimiento de la espectrometría de masas

Durante la última década del siglo XIX, el científico británico Joseph John Thomson (1856-1940) realizó una serie de experimentos con rayos catódicos que condujeron al descubrimiento del electrón [1]. Utilizando un tubo de rayos catódicos en alto vacío, Thomson demostró que los rayos podían deflectarse bajo la influencia de un campo magnético o eléctrico y que la carga negativa era una propiedad intrínseca de dichos rayos. En 1897, Thomson determinó que la relación m/z de los rayos catódicos era más de mil veces menor que la del ión H^+ (hoy sabemos que un protón es unas 1836 veces más masivo que un electrón), sugiriendo que se trataba de partículas muy pequeñas o altamente cargadas [1]. Esta revolucionaria conclusión implicaba que los rayos catódicos estaban constituidos por partículas subatómicas emitidas por los átomos del electrodo, a las que Thomson denominó “corpúsculos”, y que - por tanto- los átomos (del griego $\alpha\tau\omicron\mu\omicron\nu$, *indivisible*) no eran las entidades elementales de la materia postuladas por la escuela atomista en la Antigua Grecia. Los

corpúsculos descubiertos por Thomson resultaron ser *electrones*, término acuñado en 1891 por el físico irlandés George Johnstone Stoney (1826-1911) para “la unidad fundamental de carga eléctrica”.

En 1913, en el marco de sus investigaciones sobre rayos anódicos, Thomson midió la influencia de campos eléctrico y magnético sobre un haz de neón ionizado, observando su descomposición en dos parábolas de deflexión. Thomson concluyó que el neón está compuesto por una mezcla de dos isótopos de masas atómicas 20 y 22. Esta observación representó la primera evidencia de la existencia de isótopos de un elemento estable. La separación de los isótopos del neón se considera el experimento que supuso el nacimiento de la espectrometría de masas, aunque la técnica, como método analítico capaz de determinar la composición isotópica de los elementos, fué posteriormente desarrollada por Arthur Jeffrey Dempster y Francis William Aston [2] entre 1918 y 1919. Thomson (Premio Nobel de Física de 1906), Demster, y Aston (Premio Nobel de Química de 1922) son considerados los fundadores de la espectrometría de masas moderna [3].

2. Unidades de m/z y el defecto de masa atómica

Aunque resulte paradójico, los analizadores (espectrómetros) de masas no miden la masa sino la relación masa/carga (m/z) de compuestos ionizados, siendo “m” la masa molecular del compuesto y “z” un múltiplo de la carga elemental (e) del electrón. La relación m/z es adimensional al estar basada en la escala de Unidades Atómicas (UA) de Hartree (http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_unit) desde que en 1961 la IUPAC adoptó como unidad de masa atómica (uma) la doceava parte de la masa del ^{12}C , el isótopo natural más abundante del carbono, como base para asignar la masa atómica relativa de todos los demás elementos químicos. De acuerdo a esta convención, la masa de 1 átomo de ^{12}C es 12 uma. También por definición, la unidad de carga eléctrica, e, en la escala UA es exactamente igual a 1.

La denominación más frecuentemente utilizada para la unidad de masa atómica (uma) es el “Dalton” (Da), término acuñado en honor de John Dalton (1766-1844), químico y físico británico, quien en 1803 formuló la *Ley de las Proporciones Múltiples* que postula que los pesos de dos elementos siempre se combinan entre sí en proporciones de números enteros pequeños. En ese mismo año Dalton publicó su primera lista de pesos atómicos y símbolos, y en 1808 expuso la teoría atómica en la que se basa la física moderna. 1 Da se corresponde aproximadamente con la masa de un protón (o un átomo de Hidrógeno, ^1H). En honor del descubridor del electrón y fundador de la espectrometría de masas, Cooks y Rockwook propusieron en 1991 el Thomson (Th) como unidad de m/z [4]. 1 Th equivale a 1 Da/e y, por tanto, para iones monocargados, y sólo en este caso, la masa en Da de un ión coincide con su relación m/z.

1 gramo equivale a la masa 1 mol (N_A) de unidades de masa atómica. Así pues, un mol de átomos de ^{12}C tiene una masa de 12 g y, por tanto, el valor de 1 uma en unidades del SI se obtiene mediante la fórmula $12 \text{ g}/(12N_A) = 1/(6,02214199 \times 10^{23}) = 1,66053873 \times 10^{-27} \text{ kg}$. Un átomo de ^{12}C está formado por 6 protones, 6 neutrones y 6 electrones. Las masas experimentales en reposo del protón (m_p), neutrón (m_n) y electrón (m_e) son $1,67265 \times 10^{-27} \text{ kg}$ ($1,0072935 \text{ u.m.a.}$), $1,67495 \times 10^{-27} \text{ kg}$ ($1,0086786 \text{ uma}$) y $9,10938215 \times 10^{-31} \text{ kg}$ ($0,0005485799 \text{ uma}$), respectivamente. La masa atómica asignada al ^{12}C (m_{asig} , 12,0000) es menor que su masa atómica cal-

culada (m_{calc}) a partir de su composición subatómica, incluso tomando en consideración el efecto relativista de pérdida de masa debido a la energía ($E = mc^2$) liberada en la formación del núcleo atómico.

El defecto de masa (m_{def}) se calcula mediante la ecuación: $m_{\text{def}} = m_{\text{asig}} - m_{\text{calc}} = 12,0000 - (1,0072935 n_p + 1,0086786 n_n + 0,0005485799 n_e) = -0,0958 \text{ uma}$, siendo n_p , n_n y n_e el número de protones, neutrones y electrones constituyentes del átomo. Por convención, en la escala de UA el defecto de masa del ^{12}C se cancela aproximando las masas del protón y del neutrón a 1 uma [5]. De esta manera la masa atómica del ^{12}C (12 uma) coincide con su número másico ($6p + 6n$). Las masas de todos los demás átomos calculadas en relación a la masa del ^{12}C se desvían, por exceso o defecto, de su número de nucleones. En el caso de los átomos más abundantes en las biomoléculas la desviación entre masa atómica y número másico es: ^{14}N , +0.00307 uma; ^{16}O , -0.00509 uma; ^1H , +0.007825 uma; ^{31}P , 0,02624 uma; ^{32}S , 0,02793 uma (Tabla). Aunque pequeñas, estas diferencias deben tenerse en cuenta a la hora de comparar masas experimentales determinadas por espectrometría de masas con valores teóricos calculados sumando las masas atómicas de los átomos constituyentes del ión. Además, la comparación entre masa experimental y teórica sólo tiene sentido si ambas magnitudes están expresadas en las mismas unidades, que en el caso que nos ocupa son unidades de masa atómica relativas a la del ^{12}C .

3. Iones quasimoleculares

El cálculo de la masa molecular de un compuesto a partir de su espectro de masas requiere también un entendimiento del proceso de ionización (¿resultó alterada la composición y/o la ordenación atómica del compuesto al ionizarse?), así como la determinación de la carga (z) del correspondiente ión. En el caso de moléculas biológicas, las técnicas de ionización más utilizadas son la electronebulización (electrospray, ESI) [6] y la desorción por radiación láser asistida por una matriz (MALDI, *matrix-assisted laser-desorption ionization*) [7,8]. ESI y MALDI se engloban en el conjunto de técnicas de ionización “suave” (*soft ionization*) caracterizados por producir iones de analitos intactos que no muestran una tendencia significativa a fragmentarse espontáneamente. Una descripción pormenorizada de los principios operacionales de estas técnicas excede los objetivos de este artículo. Baste mencionar aquí que tanto ESI como MALDI producen

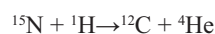
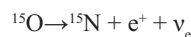
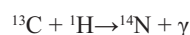
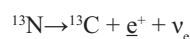
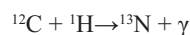
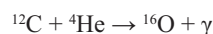
iones quasimoleculares $(M+nH)^{n+}$ y $(M-nH)^{n-}$ por captación o pérdida de protones [9]. La detección de iones quasimoleculares positivos o negativos está en función de la polaridad de medida del analizador de masa seleccionada por el operario, y el número de protones (nH^+) captados o cedidos por el analito depende tanto de la estructura del compuesto como de las condiciones de ionización empleado. La tendencia de un compuesto (Y) por generar iones protonados es proporcional a su basicidad relativa (ΔG_B) en la fase gaseosa, considerando la basicidad en el sentido empleado por Lewis-Brønsted, como una medida de la tendencia del ión a captar un protón. En el equilibrio $XH^+ + Y \rightleftharpoons X + YH^+$ (donde XH^+ representa un donante de protones, como es el solvente en ESI y la matriz en MALDI), $\Delta G_B = -RT \ln ([X][YH^+]/([Y][XH^+])$. Por tanto, las condiciones experimentales para producir iones protonados mediante ESI o MALDI deben ajustarse para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la derecha. MALDI tiende a producir iones monocargados mientras que ESI genera series de iones multicargados. Más adelante veremos como esta última circunstancia posibilita la determinación de la masa de macromoléculas en instrumentos cuyo rango de medida de m/z (< 4000) es muy inferior a la masa molecular del analito.

En experimentos con mezclas se observa frecuentemente el fenómeno de supresión de la ionización de compuestos de baja basicidad relativa por aquellos de más alta ΔG_B . Conviene recordar este hecho pues un espectro de masas refleja la intensidad relativa de los iones detectados, qué no tiene por qué equivaler a “la abundancia relativa de los compuestos en la muestra analizada”. En el caso de polipéptidos, los protones se adicionan a sitios de alta basicidad (grupos amino terminal, ϵ -amino de lisinas, guanidino de argininas, e imidazol de histidinas), o se liberan de grupos ácidos (aspártico, glutámico, grupo fenol de la tirosina, fosfórico, etc.), generándose, en ambos casos los iones quasimoleculares $M+H^+$ y $M-H^-$, respectivamente. La masa molecular (M) de estos iones puede calcularse a partir de las ecuaciones $M = [(m/z) \times z] - nm_H^+$ ó $M = [(m/z) \times z] + nm_H^+$, dependiendo de que la medida de m/z se haya realizado en modo positivo o negativo, respectivamente, y donde nm_H^+ es la masa de los protones captados o cedidos en la ionización. Pero no nos adelantemos, porque antes de pasar a describir cómo se deduce una masa molecular a partir de un espectro de masas debemos

hacernos la siguiente pregunta: ¿cada compuesto químico tiene una masa molecular única? En otras palabras, ¿cómo se calcula la masa molecular de un compuesto a partir de su fórmula química? La respuesta inmediata es “sumando las masas de todos los átomos de la estructura”, y ahí es donde reside el *quid* de la cuestión: ¿qué valores de masa atómica debemos considerar? Para responder a esta pregunta retrocedamos a los orígenes de la materia...

4. Isótopos y distribución de masa molecular

La nucleosíntesis ocurrió en los primeros tres minutos después del Big Bang cuando el Universo en expansión se hubo enfriado lo suficiente como para formar protones y neutrones estables [10,11]. La nucleosíntesis del Big Bang es responsable de las relaciones de abundancia de los elementos más ligeros que el Berilio, 1H , 2H , 3He , 4He , y 7Li . El resto de los elementos de la tabla periódica se sintetizaron posteriormente mediante procesos de nucleosíntesis estelar, mediante el ciclo del carbono-nitrógeno-oxígeno (CNO) propuesto en 1938 por Hans Bethe [12] y cuyas ecuaciones más básicas son:



Las reacciones de nucleosíntesis por fusión nuclear en estrellas de masa menor a 1.4 masas solares (límite de Chandrasekhar) sólo producen elementos hasta el ^{56}Fe , el núcleo atómico más estable; los elementos más pesados se producen por procesos de captura neutrónica en estrellas más masivas. Una consecuencia de la nucleosíntesis estelar es la existencia de isótopos. Nombrados a partir del griego *isos*, mismo, y *topos*, lugar, debido a que ocupan el mismo lugar en la Tabla Periódica de los

Elementos, los isótopos son átomos que tienen el mismo número atómico (número de protones en el núcleo), pero diferente número másico (suma del número de neutrones y el de protones en el núcleo). Difieren pues en el número de neutrones, por lo que los isótopos tienen el mismo número de electrones (y carga eléctrica) y, por tanto, difieren en masa pero poseen las mismas propiedades químicas.

Exceptuando los elementos radiactivos, la composición isotópica de los átomos que se encuentran en la naturaleza es esencialmente constante (al menos desde que sabemos como determinarla). La siguiente Tabla muestra los isótopos estables de los principales átomos que forman las estructuras covalentes de toda la materia biológica conocida [13]:

Elemento	Isótopo	Abundancia (%)	Masa atómica (uma)
Hidrógeno	¹ H	99,9885	1,007825
	² H	0,0115	2,014101
Carbono	¹² C	98,93	12,00000
	¹³ C	1,07	13,00335
Nitrógeno	¹⁴ N	99,632	14,00307
	¹⁵ N	0,368	15,00010
Oxígeno	¹⁶ O	99,757	15,99491
	¹⁷ O	0,038	16,99491
	¹⁸ O	0,205	17,99716
Fósforo	³¹ P	100	30,97376
Azufre	³² S	95,02	31,97207
	³³ S	0,75	32,97145
	³⁴ S	4,21	33,96786
	³⁶ S	0,02	35,96708

Las masas atómicas de los átomos de elementos di- o poliisotópicos de la Tabla Periódica (<http://tablaplus.awardspace.com/Tabla.html>) se calculan como la media ponderada de las masas de sus distintos isótopos teniendo en cuenta la abundancia relativa de cada uno de ellos. Consideremos el carbono como ejemplo. Este elemento consta de dos isótopos estables (Tabla): ¹²C (abundancia relativa, 98,93%) y ¹³C (1,07%). La suma ponderada de las masas de cada isótopo da: (0,9893 x 12,000) + (0,0107 x 13,0035) = 12,0107 uma.

La composición química de toda la materia de nuestro planeta refleja las relaciones de abundancia de los átomos de la nube primigenia de polvo y gas expulsada al espacio en explosiones de Supernova y que constituyó la materia prima a partir de la cual se formó el Sistema Solar. Ello implica que, por ejemplo, por término medio, de cada 100.000 átomos de carbono 1070 son ¹³C. Igualmente, existen, respectivamente, 11,5 átomos de ²H y 368 de ¹⁵N en cada 100.000 átomos de hidrógeno y nitrógeno. Esta circunstancia equivale a decir que las moléculas no poseen una masa molecular única sino una distribución de masas. En el caso de moléculas que, como las proteínas y otras macromoléculas biológicas, están constituidas por elementos cuyos isótopos más abundantes son los de menor masa atómica (Tabla), el primer pico (M) de la distribución isotópica corresponde al ión *monoisotópico*. Este ión es único en la distribución isotópica al ser una especie homogénea constituida por los isótopos, ¹H, ¹²C, ¹⁴N y ¹⁶O, ³²S, etc. Todos los demás picos corresponden a poblaciones heterogéneas de iones que contienen combinaciones de isótopos sucesivamente más pesados. Por ejemplo, el pico M+1 (segundo pico o pico del primer isótopo) corresponde a iones que contienen un ¹³C o un ¹⁵N o un ³³S etc. y, por tanto, aproximadamente una unidad de masa más que el monoisotópico; los iones M+2 (pico del segundo isótopo) poseen 2 ¹³C ó 2 ¹⁵N ó 1 ¹⁸O, ó (1 ¹³C + 1 ¹⁵N) ó (1 ¹³C + 1 ³³S, etc..) y son aproximadamente 2 unidades de masa atómica (uma) más pesados que M; y los iones M+3, ... M+n poseen, sucesivamente, masas que exceden desde ~ 3 hasta “n” uma a la masa del ión monoisotópico. Es importante insistir en el carácter aproximado de los cálculos anteriores, dado que la diferencia de masa entre isótopos consecutivos de diferentes átomos no es exactamente igual a 1 uma, ni siquiera es la misma para todos los átomos poliisotópicos: ¹³C - ¹²C = 1,00335 uma; ¹⁵N - ¹⁴N = 0,99703 uma; ²H - ¹H = 1,006276 uma, etc. (Tabla). De hecho, en analizadores de masa de muy alta resolución los picos M+1, M+2, etc. llegan a desdoblarse en los iones correspondientes a los isótopos de los diferentes átomos constituyentes¹.

¹ Por esta razón se utilizan las masas de iones monoisotópicos de péptidos tripticos para identificar proteínas mediante experimentos de huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*, PMF). La especificidad de este método, desarrollado en 1993 independientemente por varios grupos de investigación [16-20], depende críticamente de la exactitud de las masas utilizados para interrogar al banco de datos de referencia. El ión monoisotópico es la única especie cuya masa está perfectamente definida por su composición atómica y, por tanto, su medida conlleva

Una consecuencia de la disparidad de incrementos de masa entre los isótopos consecutivos de diferentes átomos es que compuestos de fórmulas empíricas diferentes también difieren en su masa exacta. En otras palabras: la masa, medida con suficiente exactitud, es una característica única y discriminatoria de compuestos no isoméricos.

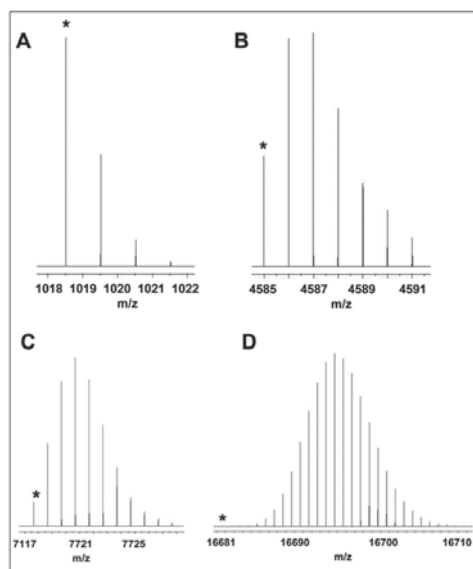


Figura 1. Simulación por deconvolución con ChemCalc (<http://www.chemcalc.org>) de las distribuciones isotópicas de (A) un nonapéptido (M_{mono} , 1018.5 Da) de fórmula empírica $C_{44}H_{70}N_{14}O_{12}S$, (B) un polipéptido de ~ 4.5 kDa de masa molecular y fórmula $C_{186}H_{293}N_{59}O_{61}S_8$, (C) una proteína de ~7 kDa ($C_{318}H_{502}N_{102}O_{119}S_{14}$) y (D) una proteína de masa molecular monoisotópica 16.681,6 Da y fórmula $C_{1253}H_{224}N_{42}O_{50}S$. Se aprecia claramente el corrimiento hacia la derecha de la intensidad relativa de los picos isotópicos a medida que aumenta la masa molecular. En A-D, el ión monoisotópico está señalado con un asterisco.

La abundancia relativa de los picos de la distribución isotópica de una molécula puede calcularse a partir de su fórmula química mediante el desarrollo en sumandos de un polinomio del tipo $(a_1 + a_2 + a_3 + \dots)^X (b_1 + b_2 + b_3 + \dots)^Y (c_1 + c_2 + c_3 + \dots)^Z \dots$, representando las series " $n_1 + n_2 + n_3 + \dots$ " la abundancia relativa de los isótopos del elemento " n " y los exponentes X, Y, Z, etc. el número de átomos del correspondiente elemento en la fórmula [14,15]. La distribución isotópica de un péptido sencillo como es el glucagón, de 29 residuos, cuya fórmula es $C_{153}H_{224}N_{42}O_{50}S$, contiene un enorme

número de términos: $(0,9889 + 0,0107)^{153} (0,999885 + 0,000115)^{224} (0,99632 + 0,00368)^{42} (0,99757 + 0,00038 + 0,00204)^{50} (0,9502 + 0,0075 + 0,0421 + 0,0002)$, que hace su cálculo inviable manualmente. Existen, no obstante, sencillos programas de ordenador para computar por deconvolución matemática la distribución isotópica teórica a partir de la fórmula empírica (ej. <http://www.chemcalc.org/>).

Es mucho más sencillo calcular la altura relativa de los picos isotópicos. Así, el cociente $(M+1)/M = \Sigma(\%I \times nE)/(100 - \%I)$, siendo %I la abundancia relativa del elemento E y nE el número de átomos de ese elemento en la molécula. Para el glucagón, la abundancia relativa del pico isotópico (M+1) respecto al ión monoisotópico es: $(1,07 \times 153)/0,9893 + (0,0115 \times 224)/0,999885 + (0,368 \times 42)/0,99632 + (0,038 \times 50)/0,99962 + (0,205 \times 50)/0,99795 + 0,75 = 196,49\%$. Puede demostrarse fácilmente que la abundancia relativa de los picos isotópicos se desplaza hacia la derecha a medida que aumenta la masa molecular del compuesto. Este punto queda ilustrado en la Fig. 1.

La distribución isotópica es una característica diferencial de cada molécula poliatómica compuesta por elementos poliisotópicos. Así, dos compuestos de igual masa molecular pero diferente fórmula química difieren en sus diagramas de distribución isotópica. Este hecho es ampliamente utilizado en Química Analítica como prueba de la correcta asignación estructural de un compuesto [9]. La determinación de la distribución isotópica es la única técnica apta para la detección de pequeñas alteraciones isotópicas en muestras geológicas y medioambientales, que pongan de manifiesto procesos naturales o antropogénicos sobre el entorno, con incertidumbres inferiores al 1%. Asimismo, la manipulación de la distribución isotópica de una molécula mediante técnicas de marcaje isotópico ha permitido el desarrollo de métodos de comparación de la abundancia relativa de proteínas (ej. ICAT, iTRAQ, SILAC, etc.) con los que explorar la dinámica molecular del proteoma celular [21,22]. Estas metodologías son de gran relevancia para detectar cambios en la expresión de proteínas asociados a procesos fisiológicos o patológicos celulares. Además, el uso de trazadores isotópicos, enriquecidos en algún isótopo minoritario en la naturaleza, permite medidas absolutas de cantidad de sustancia mediante el método de dilución isotópica [23]. Esta técnica en conjunción con la espectrometría de masas con fuente de plasma (ICP-MS) constituye una herramienta imprescindible

la mínima dispersión respecto a los demás picos iónicos de la distribución isotópica.

dible para la detección y cuantificación de heteroátomos [24] que, como el fósforo, desempeñan un papel fundamental en la regulación de procesos biológicos. Por su relevancia, una descripción detallada de los protocolos de proteómica cuantitativa merece un capítulo aparte.

5. Resolución, precisión, exactitud y reproducibilidad

La capacidad de un espectrómetro de masas de distinguir entre las masas de dos picos adyacentes se expresa normalmente en términos de su resolución. Con una resolución adecuada, un espectrómetro de masas puede separar los picos (MH^+ , MH^++1 , MH^++2 ...) de una distribución isotópica (Fig.2).

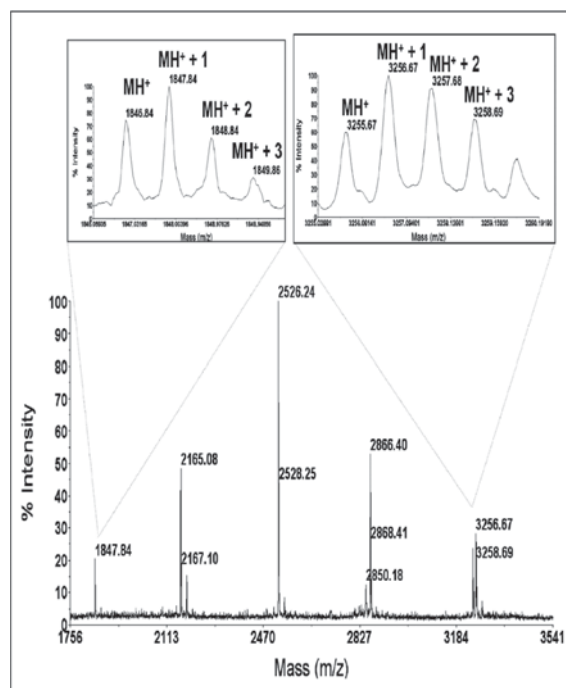


Figura 2. Espectro de masas de una mezcla de péptidos obtenido con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo reflectrón. Se muestran las distribuciones isotópicas de los iones monocargados de m/z 1846,48 y 3255,67. MH^+ , MH^++1 , MH^++2 , y MH^++3 corresponden, respectivamente, a los picos monoisotópicos, del primer isótopo (también denominado del ^{13}C), del segundo isótopo, y del tercer isótopo.

La resolución (R) se define como $M/\Delta M$. ΔM es la diferencia entre las masas de dos picos adyacentes que están resueltos y M corresponde a la masa sin decimales del primer pico. Dos picos próximos se consideran resueltos cuando la altura del valle entre

ellos no sobrepasa un determinado porcentaje, que debe ser especificado, de la altura media de ambos. Así, utilizando esta definición de la resolución, un espectrómetro capaz de resolver picos que tengan valores de m/z de 400,0 y 400,1 debería tener una $R \geq 4000$. El valor de la resolución calculada de esta manera varía para diferentes rangos de masa del mismo espectro: en el espectro de la Fig.2, $R = 1846$ para m/z 1846 pero 3255 para m/z 3255. Por ello, prefiere definirse ΔM como el incremento de m/z a una determinada altura (comunmente 50%) del pico M . En la literatura en lengua inglesa, el término estándar para este valor es “FWHM” (*full width at half mass*). Esta manera de calcular R proporciona valores esencialmente constantes en todo el rango de m/z. El espectro de la Fig.2 fue adquirido con una resolución de ~ 9000 , suficiente para resolver la distribución isotópica de los iones resaltados ($R = 1846/0,2 = 9230$; $R = 3255/0,36 = 9041$). En el ejemplo de la Fig.3, la resolución obtenida en el espectro del panel A fue $665,3/0,24 = 2.772$, casi en el límite del valor requerido para separar los picos isotópicos de este ión doblemente cargado. Esta misma resolución fue insuficiente para resolver adecuadamente (a 50% de la altura) los picos isotópicos del ión triplemente cargado m/z 898 (panel B).

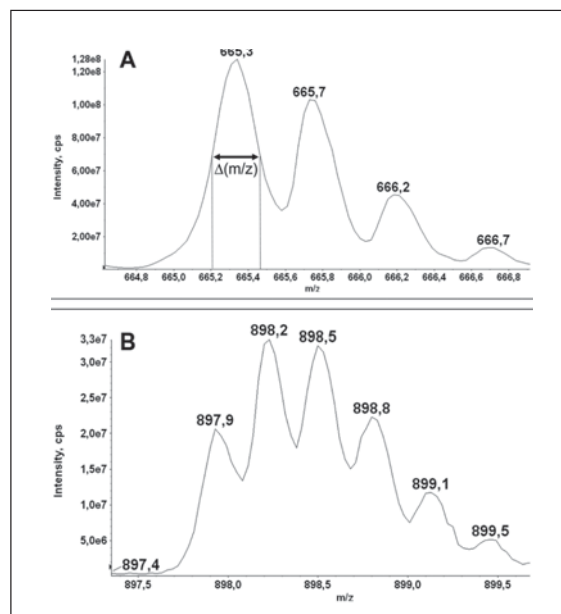


Figura 3. Espectro de resolución de los iones m/z 665,3 y 897,9 obtenidos mediante ionización por electrospray en un espectrómetro QTrap2000 (Applied Biosystems). La diferencia de 0,5 Th (A) y 0,3 Th (B) entre los picos de la distribución isotópica indica que los iones corresponden a $(M+2H)^{2+}$ (dicargado) y $(M+3H)^{3+}$ (tricargado), respectivamente, y sus masas moleculares son pues: $(665,3 \times 2) - (2 \times 1,007825) = 1328,58$ Da y $(887,9 \times 3) - (3 \times 1,007825) = 2260,67$ Da.

Para lograr resolución isotópica los centroides de los iones de la distribución deben estar separados, a mitad altura, por un $\Delta(m/z) \geq 1/2z$. Los analizadores de masas más comúnmente utilizados en Proteómica (de tiempo de vuelo -TOF-, de transformada de Fourier -FT-, triple cuadrupolos, trampas iónicas, Orbitraps, etc.) alcanzan resoluciones > 10.000 , pudiendo llegar en el caso del Orbitrap a superar 100.000 y alcanzar $> 2.000.000$ en el de los analizadores de transformada de Fourier (FTMS) [25]. No hay que confundir resolución, que es una característica propia de cada tipo de espectrómetro de masas, con precisión o con exactitud. La precisión se refiere a lo cerca que están unas de otras un conjunto de mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones. Esta cualidad debe evaluarse a corto plazo y tampoco debe confundirse con reproducibilidad (capacidad de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones experimentales a lo largo de periodos dilatados de tiempo). La precisión se expresa como una indicación del error máximo estimado para la magnitud. Es, pues, es una medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio. Así, la media de las medidas de m/z {479,220; 479,229; 479,218; 479,227} de un ión de fórmula $C_{18}H_{33}N_5O_{10}$ (masa exacta: 479,2230 Da) es un valor muy exacto (479,2235) pero poco preciso ($\pm 0,06$); en cambio el conjunto de medidas {482,220; 482,221; 482,220; 482,219} corresponde a un valor medio muy preciso ($\pm 0,01$) pero poco exacto. Quizás los términos más utilizados para cuantificar el error experimental son la *desviación estándar* o *desviación típica* (σ) [26], incorporado a la estadística por Karl Pearson en 1894 y definido actualmente como la raíz cuadrada de la varianza (la media de las diferencias con la media elevadas al cuadrado [27]), y la *desviación media* (media de las diferencias en valor absoluto de los valores a la media). Así, la desviación estándar de los valores de m/z 1235,456, 1235,458, 1235,452 y 1235,454 obtenidos de mediciones repetidas para el mismo ión es ± 0.0022 Th, y la desviación media es $\pm 0,002$ Th, sobre un valor promedio de 1235,455 Th.

La exactitud es una estimación de la cercanía entre el valor real y el valor medido. En espectrometría de masas representa la proximidad del valor de m/z registrado experimentalmente (M_{medida}) a su valor calculado ($M_{calculada}$). La exactitud de una medición de masa se expresa mediante el error relativo, frecuentemente en partes por millón (ppm), que representa la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero en relación al valor experimental:

$$\text{ppm} = [(M_{calculada} - M_{medida})/M_{calculada}] \times 10^6$$

Así, la masa exacta calculada para el ión monoisotópico a m/z 1846,84 de la Figura 1 es 1846,836. La exactitud de la medida fue, por tanto, $(1846,84 - 1846,838)/1846,836 = 2,16 \times 10^{-6}$, o 2 ppm.

El poder resolutivo es una propiedad intrínseca de cada analizador de masas; la exactitud de una medida de masa depende, además del sistema de medida, de parámetros externos como la calibración del instrumento y de la intensidad (concentración) de los iones. Las medidas realizadas en un instrumento de alta resolución pero mal calibrado serán poco exactas pero muy precisas, y en general reproducibles al tratarse de un error sistemático, un sesgo que hace que todas las medidas estén desviadas en una cierta cantidad. Por otra parte, en el rango de masas altas (ej. proteínas medidas en un analizador de tiempo de vuelo como el ejemplo mostrado en las Figs.4 y 5), cuando la resolución es insuficiente para separar los iones de la distribución isotópica (como es el caso de los espectros de ionización por electrospray de proteínas mostrados en las Fig.6), la geometría de los picos espectrales de los iones depende en gran medida del número de espectros acumulados. Además, la geometría de un pico espectral está en función de la resolución del espectrómetro de masas, pudiendo modelarse como una mezcla entre doble exponencial y gaussiana a resoluciones > 4000 y como una sigmoide (o gaussiana) doble asimétrica a resoluciones < 1000 . Dado que se considera como medida promedio de la masa el valor de m/z en el centroide del pico, cualquier fluctuación que distorsione la geometría (Fig.5B) de un pico iónico afectará pues al cálculo ulterior de su masa.

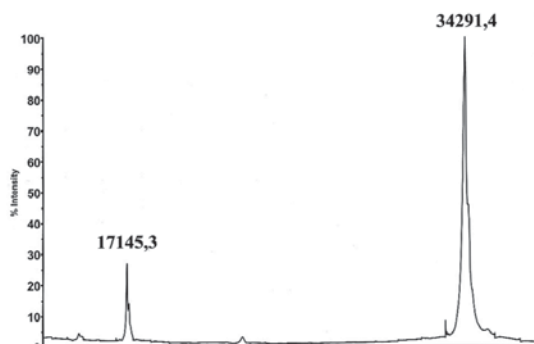


Figura 4. Panel superior, espectro de masas de una proteína obtenido con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal. El ión a m/z 34.291,4 puede teóricamente corresponder la especie quasimolecular $M+H^+$ o a un dímero $(2M+H)^+$ del ión a m/z 17.145,3.

6. Cálculo de la carga (z) y de la masa molecular monoisotópica

La distribución isotópica contiene las pistas necesarias para determinar la carga y la masa del correspondiente ión. Basta con aplicar consecuentemente la siguiente regla general para cualquier espectro de masas:

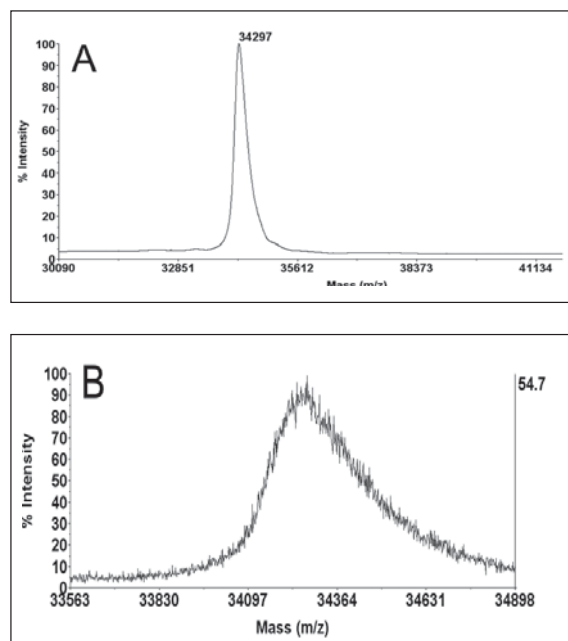


Figura 5. Panel A, espectro MALDI-TOF de una proteína de masa molecular 34,3 kDa obtenido en modo lineal. El panel B muestra un detalle del ápice del ión a m/z 34.297. La ampliación muestra el perfil en sierra de la envolvente del pico. El valor 34.297 es el calculado en el centroide del pico, pero la masa promedio exacta podría corresponder a cualquier valor incluido en 34.297 ± 35 Da.

Dado que la masa molecular de un ión cuasimolecular positivo se calcula mediante la fórmula $M = [(m/z) \times z] - zH^+$, donde zH^+ es el número de protones que el ión adquirió durante el proceso de ionización ($M \rightarrow M+zH^+$), la Regla 1 implica que el $\Delta(m/z)$ entre picos isotópicos vecinos es igual a $1/z$. En otras palabras: $z = 1/\Delta(m/z)$. En los ejemplos mostrados en la Fig.1 los iones a m/z 1847 y 3256 son ambos monocargados y sus masas cuasimoleculares (MH^+) monoisotópicas son 1845,84 y 3254,67 Th. Para iones con $z = 1$, 1 Th equivale a 1 Da, y por tanto las masas moleculares monoisotópicas de los iones de la Fig.1 son 1845, 83 y 3256,66 Da.

Regla 1: Los picos de la distribución isotópica de un ión monocargado son siempre consecutivamente mayores en una unidad de masa, comenzando por el ión monoisotópico.

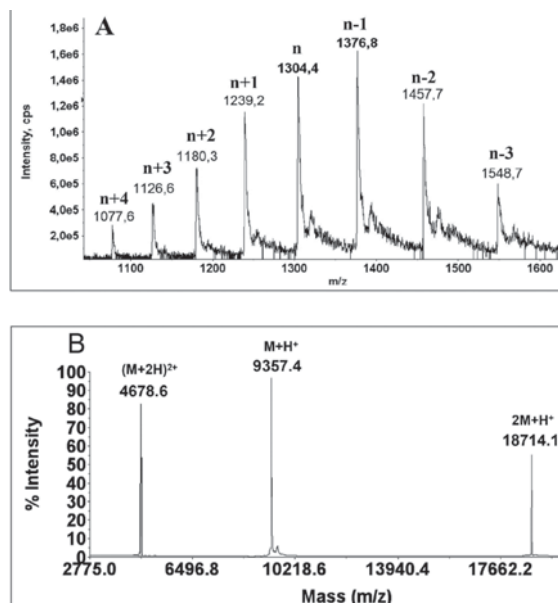


Figura 6. (A) Espectro de masas obtenido en un espectrómetro QTrap2000™ (Applied Biosystems) que muestra una serie de iones multicargados correspondiente a una proteína ionizada por electrospray. La carga “n” se ha asignado arbitrariamente al ión m/z 1304,4, quedando definidos los valores de carga de los demás iones del espectro. (B) Espectro de masas de una proteína obtenido con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal. La única solución coherente es que m/z 9357,4 sea el ión cuasimolecular $M+H^+$.

7. Determinación de z en espectros de masas moleculares promediadas

Cuando la resolución del analizador de masas no alcanza a resolver la distribución isotópica del ión la aproximación basada en la Regla 1 no es aplicable. En estas circunstancias el espectro de masas sólo muestra la envoltura de la distribución isotópica cuyo ápice corresponde al valor promediado por las abundancias relativas de los picos isotópicos (Fig.4). Esta masa se denomina masa molecular promedio (*isotope-averaged mass*, M_{av}). La M_{av} de un compuesto se calcula a partir de su fórmula química utilizando los valores de masas atómicas de la Tabla Periódica de los elementos. Retomando el ejemplo del glucagón ($C_{153}H_{224}N_{42}O_{50}S$), de masa molecular monoisotópica (M_{mono}) = $(153 \times 12,000) + (224 \times 1,007825) + (42 \times 14,00307) + (50 \times 15,99491) + 31,97207 = 3481,59931$ Da, tiene una masa molecular promedio igual a $(153 \times 12,0111) + (224 \times 1,00797) + (42 \times 14,0067) + (50 \times 15,9994) + 32,064 = 3483,7989$ Da. La diferencia entre M_{mono} y

M_{av} de moléculas como las biológicas formadas por los elementos C, H, N, O, S y P aumenta linealmente en función de su fórmula empírica de acuerdo a la ecuación:

$$M_{av} = M_{mono} + (0,0107C + 0,000075H + 0,00335N + 0,005030O + 0,08793S)$$

Los espectros obtenidos mediante MALDI (*matrix-assisted laser-desorption ionization*) corresponden generalmente a iones monocargados (MH^+), pero la formación de iones doblemente cargados ($M+2H$)²⁺ y de aductos multiméricos del ión monocargado ($MH^+ + M \rightarrow (2M+H)^+$) no es infrecuente, particularmente en el caso de macromoléculas biológicas. El espectro de la Fig. 4 probablemente corresponda a una proteína de masa molecular promedio 34.290 Da, aunque la posibilidad de que la especie m/z 17.145,3 sea el ión quasimolecular MH^+ y el ión a m/z 34.291,4 corresponda a un dímero no puede formalmente descartarse. Para distinguir entre ambas posibilidades se necesita información adicional (ej. SDS-PAGE de la proteína) o aplicar un método para determinar la carga de los iones. Afortunadamente, para ello sólo tenemos que aplicar otra regla de cumplimiento obligatorio en espectros de moléculas multicargadas:

Regla 2: Los iones multicargados de una serie poseen cargas enteras consecutivas.

La Regla 2 implica que en una serie de iones multicargados no puede faltar ningún valor intermedio de z . Antes de volver al ejemplo de la Fig. 4, apliquemos esta regla al espectro de la Fig. 6A. Para ello asignamos carga “ n ” a cualquier ión de la serie, quedando entonces definida la carga de los iones consecutivos de menor masa como $n+1$, $n+2$, etc. y los de mayor m/z como $n-1$, $n-2$, etc. Si todos los iones del espectro pertenecen a una serie de iones multicargados de la misma molécula (en este caso una proteína) podemos plantear una ecuación para cada valor de m/z :

$$M = 1304,4 n - n$$

$$M = 1239,2 (n+1) - (n+1)$$

$$M = 1376,8 (n-1) - (n-1)$$

etc.

Igualando cualquier par de ecuaciones y despejando “ n ” obtenemos:

$$1304,4n - n = 1239,2n + 1239,2 - n - 1$$

$$(1304,4 - 1239,2)n = 1238,2$$

$n = 1238,2/65,2 = 18,99$ (= 19, pues la carga tiene que ser un número entero)

De forma general, $n = (M^{n+1}-1)/(M^n-M^{n+1})$, donde M^{n+1} y M^n corresponden a los valores de m/z de los iones a los que se asigna carga “ $n+1$ ” y “ n ”, respectivamente. Habiendo determinado la carga de cada ión de la serie, el cálculo de la masa molecular promedio de la proteína es inmediato:

$$M = (1304,4 \times 19) - (19 \times 1,007825) = (1239,2 \times 20) - (20 \times 1,007825) = (1376,8 \times 18) - (18 \times 1,007825), \text{ etc.}, \text{ obteniéndose un valor de } 24764,5 \pm 1 \text{ Da. Existen, no obstante, programas sencillos que convolucionan los datos del espectro ESI en un espectro que muestra en un único pico la distribución de masa molecular promedio modelada matemáticamente para el ión monocargado.}$$

La Regla 2 puede aplicarse a cualquier espectro con tres o más iones de una misma serie para determinar inequívocamente sus cargas. Por ejemplo, en el caso de MALDI, la presencia de un tercer pico en el espectro de la Fig. 6B garantiza la deducción de la masa molecular de la correspondiente proteína sin ambigüedades. En efecto, la única solución posible es que el ión m/z 9357,4 corresponda a la especie quasimolecular $M+H^+$ y, por tanto, m/z 4678,6 sea $(M+2H)^{2+}$. Nótese que el ión m/z 18.714,1 no pertenece a la misma serie iónica que m/z 4678,6 y 9357,4, ya que ello implicaría una carga 0 para esta especie y recordemos que las partículas no cargadas son invisibles (materia oscura) para un espectrómetro de masas. m/z 18.714,1 sólo puede asignarse a un dímero monocargado $2M+H^+$. Cualquier otra solución es incongruente con la regla 2: si m/z 4678,6 fuera $M+H^+$, entonces m/z 9357,4 debería asignarse al dímero $2M+H^+$, lo cual no sería descabellado si no fuera porque en esta serie m/z 18.714,1 debiera corresponder al trímero $3M+H^+$, y claramente ese no es el caso. Igualmente, si m/z 18.714,1 fuera el ión quasimolecular, $M+H^+$, los iones m/z 9357,4 y m/z 4678,6 deberían asignarse a $(M+2H)^{2+}$ y $(M+3H)^{3+}$, siendo esta posibilidad nuevamente inconsistente con la Regla 2.

8. Polímeros versus series de iones multicargados.

En una serie de iones multicargados el $\Delta(m/z)$ entre iones consecutivos varía gradualmente, decre-

ciendo a medida que aumenta la carga. Esta característica puede utilizarse para distinguir el espectro de masas de una serie de iones multicargados y del de iones que no están relacionados entre sí por su carga. Así, los iones del espectro de la figura 7 están espaciados entre sí por un $\Delta(m/z)$ constante de aproximadamente 44 y están relacionados entre sí mediante la fórmula $m/z = [22.5 + 44(x+1)] + H^+$, siendo $x = 11$ para el ión de menor m/z . Este patrón de variación de m/z claramente indica que no puede tratarse de una serie de iones multicargados sino de una mezcla de polímeros monocargados compuestos por un número creciente de unidades de 44 Da (¿quizás bloques de CH_2-CHOH , una estructura común a muchos detergentes utilizados para solubilizar proteínas hidrofóbicas?).

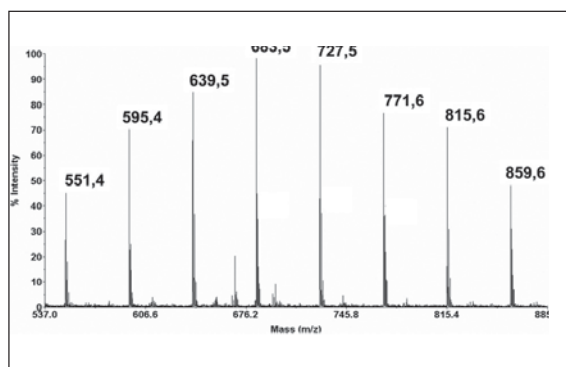


Figura 7. Espectro de masas de un polímero de fórmula $m/z = [22.5 + 44(x+1)] + H^+$ resuelto en un espectrómetro MALDI-TOF Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal.

9. Espectros con más de una serie de iones. Regla de conservación de la topología.

Un espectro de masas puede contener más de una serie de iones, por ejemplo porque se trate de una mezcla de proteínas, como en el ejemplo de la Fig. 8A. La Regla 2 nos permite identificar sin ambigüedad cada una de las series coexistentes en un mismo espectro de masas con tal de plantear las ecuaciones adecuadas. El caso más simple es cuando las series iónicas están separadas (Fig.8A). En este supuesto el inicio de la segunda serie comienza con el primer ión para el que la masa calculada asumiendo que pertenece a la primera serie se desvía significativamente del valor promedio de la serie. Así, en el ejemplo mostrado en el espectro de la Fig.8A, es fácil demostrar que el ión m/z 1102,8 no puede pertenecer a la misma serie que los iones de

mayor m/z , pues para que así fuera debería tener carga 27 y su masa molecular calculada (29.748,6 Da) es significativamente diferente del valor $29.337,5 \pm 4$ Da calculado para la serie que incluye a los iones de m/z 1129,1 a 1629,7. Además, si asignamos carga “n” a m/z 1129,1, la solución de la igualdad $M = 1129,1n - n = 1102,8(n+1) - (n+1)$ sería $n = 41,9$, que es un resultado absurdo. Por el contrario, los iones m/z 1102,8 (12+)-778,9 (17+) comprenden una serie que definen a una proteína de $13.222,3 \pm 2$ Da. Nuevamente, tanto la asignación de $z = 11$ al ión m/z 1129,1 ($M_{calc} = 12.409,1$ Da), como el valor de $n = 42,8$ calculado a partir de la ecuación $M = 1102,8n - n = 1129,1(n-1) - (n-1)$, son incongruentes con la hipótesis de que m/z 1102,8 pertenezca a la misma serie que los iones con carga +17 a +12.

Varias series de iones multicargados pueden también estar superpuestas en un mismo espectro. Cuando esto ocurre, y la masa molecular de las especies ionizadas es similar, la topología de cada grupo de iones se repite en cada rango de m/z . Esta regla de “conservación de la topología” se ilustra en el espectro del panel B de la Fig.8, que corresponde a una mezcla de isoformas de una proteína de ~ 7.3 kDa, y simplifica enormemente la identificación de los iones pertenecientes a cada serie. La Regla 3 se cumple aunque los iones de las diferentes series, agrupados por la superposición, difieran en su estado de carga (Fig.8C). Sin embargo, cuando las masas moleculares de las proteínas de la mezcla son muy diferentes la distribución de iones en el espectro no sigue la regla de conservación de la topología. El espectro de la figura 8D ilustra este punto. Ello es debido a que, de acuerdo a la Regla 2, en el rango de m/z 1000-1600, la serie teóricamente observable de la proteína de 13.783 Da abarca 5 iones, con $z = M/(m/z)$, mientras que en el mismo intervalo de medida las proteínas de masas moleculares 9001 Da y 4793 Da sólo pueden producir un máximo de 4 y 2 iones, respectivamente. No obstante, el número de iones producidos en la ionización por electrospray depende del número de protones captados (en modo positivo) o cedidos (en modo negativo) por el analito. En el caso de péptidos y proteínas, el extremo N-terminal y los residuos de histidina, arginina y lisina son los sitios que pueden protonarse a pH ácido.

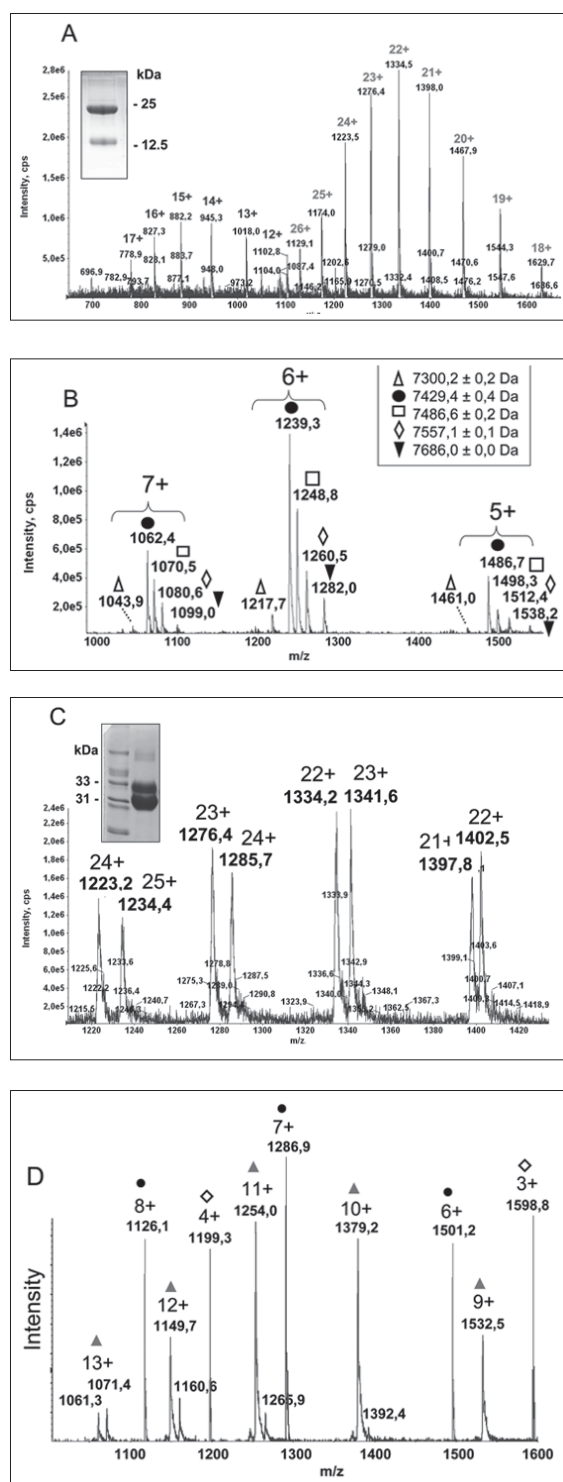


Figura 8. (A) Espectro de masas de una mezcla de dos proteínas. Las series de iones cargados con $z = 26+$ a $18+$ y con $z = 17+$ a $12+$ corresponden a toxinas aisladas de venenos de serpientes, CRISP (cysteine-rich secretory protein) cuya masa molecular promedio es $29.337,5 \pm 4$ Da y una fosfolipasa A_2 de masa molecular $13.222,3 \pm 2$ Da. (B) Espectro de masas de una mezcla de isoformas de la disintegrina barbourina aislada del veneno de *Sistrurus miliarius*

barbouri. La similitud topológica de los grupos de iones de cada rango de m/z facilita la asignación de las siguientes series de iones, que en el espectro están identificados con el mismo símbolo. (C) Detalle de un espectro de masas de una mezcla de las dos serinoproteasas de alrededor de 30 kDa analizadas en el gel de la izquierda. Las masas moleculares promedio calculadas son $29.332,8 \pm 1,1$ Da y $30.833,6 \pm 0,8$ Da. (D) Espectro de masas de una mezcla de toxinas de masas moleculares $13.783,2 \pm 1$ Da (PLA₂, serie 9+ a 13+), $9001,3 \pm 0,1$ Da (disintegrina bitistatina, serie 6+ a 8+) y $4793,3 \pm 0,1$ Da (miotoxina crotamina, iones de $z = 3+$ y $4+$). Los espectros de masas de los paneles A-D corresponden a proteínas ionizadas por electrospray y fueron obtenidos en un espectrómetro QTrap2000™ (Applied Biosystems).

Regla 3: La topología de los grupos de iones formados por la superposición de series de iones multicargados se repite a intervalos regulares de m/z .

9. Algunos enlaces útiles

Muchos son los portales de Internet dedicados a aspectos relacionados con la espectrometría de masas y sus aplicaciones. Sería interminable citarlos todos, por lo que además de las páginas Web citadas anteriormente en el texto, he seleccionado los portales del Swiss Institute of Bioinformatics, (<http://us.expasy.org/tools>), del Institute for Systems Biology (<http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/index.html>) y de Thermo-Fisher Scientific (<http://www.ionsource.com>) por contener informaciones complementarias muy útiles sobre conceptos generales de espectrometría de masas, tablas de unidades y de masas atómicas y moleculares, calculadoras diversas y programas de conversión de datos, manuales para iniciarse en la interpretación de espectros, enlaces a otros portales de interés, etc. Espero que el lector interesado en la espectrometría de masas, especialmente en su vertiente biológica, disfrute navegando por estos hiperspacios.

Corolario

Arthur C. Clarke, el genial científico británico (1917-2008) que en 1945 sentó las bases de los satélites artificiales en órbita geoestacionaria (llamada en su honor órbita Clarke), es quizás más conocido por sus famosas Leyes de Clarke. Publicadas en su libro de divulgación científica *Perfiles del Futuro* (1962), la más popular (y citada) de ellas es la llamada «Tercera Ley de Clarke»: *Toda tecnología lo suficientemente avanzada es indistinguible de la magia*. Y ¿acaso no es magia hacer volar elefan-

tes moleculares? La diferencia entre ilusionismo y espectrometría de masas es que los magos crean la ilusión de que hacen volar elefantes desafiando las leyes de la física y la lógica, en tanto que el espectrometrista aplica la lógica de los principios físicos para hacer volar elefantes y deducir sus propiedades específicas, vetadas a nuestros sentidos, únicamente observando su vuelo. La magia de la espectrometría de masas reside en que ello es posible con solo aplicar un par de reglas generales y matemáticas elementales...

Bibliografía citada

- [1] Thomson, J.J. (1906) Carriers of negative electricity. Nobel Lecture. http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1906/thomson-lecture.html
- [2] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1922/aston-lecture.pdf
- [3] <http://masspec.scripps.edu/mshistory/mshistory.php>
- [4] Cooks, R. G., Rockwood, A.L. (1991) The 'Thomson'. A suggested unit for mass spectroscopists. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, 93.
- [5] Weast, R.C. (1974) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- [6] Fenn, J.B. (2003) Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3871-3894.
- [7] Tanaka, K. (2003) The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3861-3870.
- [8] Hillenkamp, F., Peter-Katalinić, J. (2007) *MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 978-3-527-31440-9.
- [9] Watson, J.T., Sparkman, O.D. (2007) *Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation* (4th Edition), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, ISBN 978-0-470-51634-8.
- [10] Burbidge, E.M., Burbidge, G.R., Fowler, W.A. & Hoyle, F. (1957) Synthesis of the Elements in Stars. *Rev. Mod. Phys.* 29, 547-650.
- [11] Weinberg, S. Los tres primeros minutos del universo. Alianza Editorial, 1ª Ed. 1978. ISBN 84-206-2216-8.
- [12] Bethe, H.A. (1938) Energy production in stars. *Phys. Rev.* 55, 434 - 456.
- [13] Coplen, T.B. (2001) *Atomic Weights of the Elements 1999*, *Pure Appl. Chem.* 73, 667-683. (<http://physics.nist.gov/PhysRefData/Compositions/index.html>).
- [14] Gross, J.H. (2004) *Mass Spectrometry*. Springer-Verlag, Berlin, ISBN 3-540-40739-1
- [15] Kubinyi, H. (1991) Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem. *Anal. Chim. Acta* 247, 107-119.
- [16] Pappin, D.J., Højrup, P., Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3, 327-332.
- [17] Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5011-5015.
- [18] Mann, M., Højrup, P., Roepstorff, P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol. Mass Spectrom.* 22, 338-345.
- [19] James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet, G. (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 58-64.
- [20] Yates, J.R., Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal. Biochem.* 214, 397-408.
- [21] Ong, S.E., Mann, M. (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chem. Biol.* 1, 252-262.
- [22] Pan, S., Aebersold, R., Chen, R., Rush, J., Goodlett, D.R., McIntosh, M.W., Zhang, J., Brentnall, T.A. (2009) Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J. Proteome Res.* 8, 787-797.
- [23] Brun, V., Masselson, C., Garin, J., Dupuis, A. (2009) Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J. Proteomics* 72, 740-749.
- [24] Bettmer, J., Montes-Bayón, M., Encinar, J.R., Fernández-Sánchez, M.L., Fernández de la Campa, M. R., Sanz-Medel, A. (2009) The

- emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *J. Proteomics* 72, 989-1005.
- [25] Gelpí, E. (2009) From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part II 1985–2000. *J. Mass Spectrom.* 44, 1137-1161.
- [26] <http://www.disfrutalasmaticas.com/datos/desviacion-estandar-calculadora.html>
- [27] <http://www.disfrutalasmaticas.com/datos/desviacion-estandar.html>